

TARTU ÜLIKOOL

Arstiteaduskond

Anatoomia instituut

DENIS UKSOV

**Uudse kombineeritud fiksaatori võrdlus
plaatfiksaatoriga toruluu murdude paranemisel:
eksperimentaalne morfoloogiline uuring**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendajad:

Dotsent Marina Aunapuu

Professor Andres Arend

Professor Vladimir Andrianov (EMÜ)

Tartu 2010

SISUKORD

SISUKORD	2
1. KASUTATUD LÜHENDID	4
2. SISSEJUHATUS.....	5
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
3.1. Ortopeedia areng ja võimalused tänapäeval.....	6
3.2. Luukoe üldiseloostus.....	6
3.3. Luu biokeemilised markerid.....	9
3.3.1. Alkaalne fosfataas	9
3.3.2. Osteokaltsiin.....	10
3.3.3. Osteopontiin	10
3.3.4. Kollageenid	10
3.3.5. Kaltsitoniin	11
3.3.6. Telopeptiidid	12
4. LUUMURRUD	13
5. LUUMURRU REGENERATSIOON	15
6. LUU OSTEOSÜNTEES JA FIKSAATORID TÄNAPÄEVAL	17
7. Dr. A. SEPPO FIKSAATOR	19
8. UUDNE KOMBINEERITUD LUUFIKSAATOR.....	21
9. TÖÖ EESMÄRGID	23
10. MATERJALID JA METOODIKA	24
10.1. Katseloomad.....	24
10.2. Operatsiooni metoodika	24
10.2.1. Ettevalmistus operatsiooniks.....	24
10.2.2. Anesteesia.....	24
10.2.3. Operatsioon	24
10.3. Vere biokeemia	25
10.4. Röntgenoloogia	26
10.5. Katseloomade tervisliku seisundi monitooring	26
10.6. Eutanaasia.....	26
10.7. Histoloogilised uuringud	26
10.7.1. Hematoksülin & Eosiin – ülevaatevärving	27
10.7.2. Van Gieson – sidekoe värving	27

10.7.3. Immunohistokeemia	28
10.8. Statistiline analüüs	28
11. TULEMUSED	29
11.1. Füsioloogiline seisund	29
11.2. Vere biokeemia	29
11.3. Röntgenoloogia	32
11.4. Histoloogia	32
11.5. Immunohistokeemia	34
12. ARUTELU	36
13. JÄRELDUSED	40
14. KOKKUVÕTE	41
15. SUMMARY	43
16. KASUTATUD KIRJANDUS	45
17. TÄNUAVALDUSED	49
18. LISAD	50
18.1. Röntgenoloogia	50
18.2 Morfoloogilised uuringud	51

1. KASUTATUD LÜHENDID

AO – (*Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefrage*)

ALP – Alkaalne fosfataas, aluseline fosfataas (*alkaline phosphatase*)

BGP – luu Gla-proteiin e. osteokaltsiin (*bone Gla-protein*)

DAB - diaminobensidiin

DCP – kompressioon plaatfiksaator

ECM – ekstratsellulaarne maatriks (*extracellular matrix*)

H&E – hematoksüliin-eosiin

ICTP – C-terminaalne telopeptiid (*C-terminal telopeptide*)

isoE – isoensüüm

i/v – veeniseselt

kD – kiloDalton (*kiloDalton*)

kVp – kilovoltaaži tipp (*kilovoltage peak*)

LCP – lukustuv kompressioonplaat (*Locking Compression Plate*)

mAs – milliamper sekund

MEN2 – perekondlik endokriinne hulgikasvaja

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

PTH – parathormoon (*parathyroid hormone*)

s/c – nahaaluselt

TRAP - tartraatresistentne happeline fosfataas (*tartrate-resistant acid phosphatase*)

2. SISSEJUHATUS

Luukoe üks põhilisi funktsioone on tugifunktsioon, millest tulenevalt on tegemist ka ühe tugevaima koega organismis. Seoses sellega on lähenemine luumurru ravile mõnevõrra erinev teistest kirurgilistest manipulatsioonidest, kuna materjal, millega ümber käiakse, on nii füüsikaliselt kui ka morfoloogiliselt teistest kudedest tunduvalt erinev. Oma struktuurset ja füüsikalisest eripärast, kui ka esinevate luumurdude iseloomust, esineb praktikas erinevaid luumurdude klassifikatsioone.

Luu vigastuste tekkel omab luu märkimisväärsed paranemisevõimet. Erinevalt pehmetest kudedest, kus paranemine toimub armkoe moodustumisega, paraneb luu uue luukoe tekkega. Murru paranemine algab kalluse moodustumisega, mis ümbritseb murru piirkonda. Kalluse funktsiooniks on stabiliseerida murru piirkond ning luua ühendus luu otste vahel. Luumurru esialgne paranemine kestab tavaliselt 4 kuni 6 nädalat.

Kuivõrd esineb erinevaid luumurru tüüpe, siis on täiesti loomulik, et ühest kindlast fikseerimismeetodist jääb väheseks. Ortopeedil on vajalik leida kõige optimaalsem fikseerimismeetod, mis sobib kõige paremini antud luumurrule. Fiksatsioon peab olema minimaalselt traumeeriv ning troofikat ja verevarustust maksimaalselt säilitav, kuid samas kindlalt luud fikseeriv. Väikeloomade puhul on eriti oluline, et fiksatsioon oleks piisavalt tugev ja mugav ning võimaldaks loomal võimalikult kiiresti jäsemele toetuda, kuna loomade puhul on välistatud jäseme täielik immobilisatsioon.

Antud eksperimentaalses töös uuritakse võrdlevalt uudse kombineeritud fiksaatoriga ja plaatfiksaatoriga fikseeritud luumurdude paranemise kliinilisi ja morfoloogilisi aspekte. Töö eesmärgiks oli kinnitada või ümber lükata uudse kombineeritud fiksaatori efektiivsus võrreldes klassikalise plaatfikaatoriga pikkade toruluude murdude ravis.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Ortopeedia areng ja võimalused tänapäeval

Ortopeedia on tugi- ja liikumiselundite vigastustele, väärasenditele ja haiguste uurimisele ning ravile spetsialiseerunud arstiteaduse eriala. Ortopeedia iseseisva erialana tekkis 18. sajandil, aga esimesed teated luu vigastustest ja deformatsioonidest pärinevad peaaegu 5000 aasta tagusest ajast. Teated pärinevad Egiptuse tsivilisatsioonist nii kirjutistest, kunstiteostest kui ka inimsäilmetest 3000 aastat e.m.a. Egiptuse tsivilisatsioon mõistis üllatavalt hästi lokomotoorse süsteemi ehitust ja patoloogiate olemust. Vana-Egiptusest pärineb esimene dokument: "Edwin Smith'i papüürus", mis käsitles kirurgiat. Dokumendis oli 48 haigusjuhu kirjeldus, mis olid peamiselt traumatoloogia vallast. Arvatakse, et see papüürus on leitud või säilinud osaliselt, sest see käsitleb ainult pea-, selja- ja käevigastusi (Beasley 1982).

Antiikajast peaks kindlasti mainima Hippokratest, kelle õlaliigese paigaldamise tehnikat kasutatakse tänapäevani.

Ortopeedia mõiste ja sümboli (kõverdunud puu) võttis kasutusele Nicholas Andry (1658-1742) 1741. aastal. Sõna tulenes kreekakeelsetest sõnadest "orthos", mis tähendab sirget ja "paidios", mis tähendab last (Beasley 1986).

Ortopeedia arengu pöördepunktideks võib lugeda anesteesia, aseptika ja röntgeni avastamist 19. sajandil.

Esimese osteotoomia teostas Rhea Barton 1823. aastal. Ta tegi jäseme telje korrigeerimiseks kiilosteotoomia, saagides kiilukujulise tüki luust välja (Põkk 1989).

Tänapäeval on ortopeedia areng olnud väga kiire. Suund on minimaalinvasiivsete operatsioonide poole. Kasutatakse nii intra- kui ekstramedullaarseid fikseerimismeetodeid.

3.2. Luukoe üldiseloostus

Luukude on tugifunktsiooniga sidekoeliik, mille intertsellulaarsed komponendid on mineraliseerunud. Kaltsifitseerunud luu sisaldab umbes 25% orgaanilist maatriksit, kaasaarvatud luurakud (2-5%), 5% vett ja 70% anorgaanilisi mineraale. Luukoe keemiline koostis sõltub teatud määral toidust. Mineraalained annavad luukoele omase tugevuse, kuid vaatamata sellele on luukude suhteliselt kerge. Täiskasvanud inimese keskmine luutihedus on 1900 kg/m^3 . Põhilised mineraalained on kaltsiumfosfaat (85%), kaltsiumkarbonaat (10%) ning väheses koguses veel kaltsiumfluoriidi ja magneesiumfluoriidi. Kaltsiumfosfaat esineb hüdroksüapatiidi kristallidena $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)]$ (Arend *et al.* 1994; Leeson *et al.* 1985; Ross & Pawlina 2006).

Põhiline luumaatriksi ehituslik komponent on kollageen I ja vähesel määral kollageen V. Lisaks on leitud jälgi kollageenidest III, XI ja XIII. Kollageenid moodustavad 90% luumaatriksi valkudest, ülejäänud 10% tuleb mittekollageensetest valkudest nagu proteoglükaanid, multiadhesiivsed glükoproteiinid, kasvufaktorid ja tsütokiinid. Mittekollageensete valkude põhilised ülesanded on luuareng, remodelleerimine ja regeneratsioon (Ross & Pawlina 2006; Ekholm 2001).

Lisaks tugifunktsioonile on luul ka mitmeid teisi funktsioone: mineraalainete (Ca, Mg, P) depoo, liikumisfunktsioon (luule kinnituvad lihased). Kui veres langeb kaltsiumi või fosfori tase, siis luumaatriksist on neid võimalik mobiliseerida, et veres säiliks tase normiväärtuste piires, seega osaleb luukude ka organismi homeostaasi tagamises. Luukude koosneb rakkudevahelisest substantsist ja luurakkudest (Arend *et al.* 1994, Ross & Pawlina 2006; Sommerfeld & Rubin 2001).

Luukude esineb põhiliselt kahe vormina: lamellaarne ja põimikluukude. Põimikluukude esineb imetajatel embrüonaaleas ja on üleminekuvorm lamellaarluule. Lamellaarses luukoes kulgevad kollageensed kiud korrapäraselt ja võivad ühineda luulamellideks. Morfoloogia alusel võib lamellaarse luukoe jaotada plinkolluseks (kompaktne ehk kortikaalne luu) ja käsnolluseks (spongioosne ehk trabekulaarne luu). Tugev plinkollus moodustab luude välimise osa, põrkasid moodustav käsnollus jääb plinkollusest sissepoole. Plinkollus koosneb osteonide ehk Haversi süsteemist, mis on lamellaarse luukoe morfofunktsionaalseks ühikuks. Haversi kanalid kulgevad pikisuunaliselt ning omavahel ühendavad neid ristisuunaliselt kulgevad Volkmanni ehk perforeerivad kanalid. Osteoni kanalis asuvad luukoele vajalikud veresooned ja närvid. Kanalit ümbritsevad kontsentrilised lamellid – Haversi lamellid, lamellide vahel esinevad luulakuunid, kus paiknevad osteotsüüdid. Luulakuunid on omakorda ühenduses luukanalikeste kaudu, kus paiknevad osteotsüütide jätked. Käsnollus esineb peamiselt seljalülides ja pikkade luude epifüüsis, plinkollus aga lameluudes ja toruluude diafüüsis. Luud katab pealt periost ja luuüdi juurest endost.

Luukoest võib leida kolm täiesti eri tüüpi luurakke: matriksit tootvad osteoblastid, luukude resorbeerivad osteoklastid, ja osteotsüüdid, mis moodustavad ligi 90% kõikidest rakkudest täiskasvanud skeletis. Osteotsüüdid on kõrgelt spetsialiseerunud ja lõplikult diferentseerunud osteoblastid.

Osteoblastid ja osteotsüüdid pärinevad pluripotentsest mesenhümaalsest tüvirakust, samas kui osteoklastid tekivad mononukleaarsete prekursorite fusioonil, mis pärinevad hemopoeetilisest koest. Normaalselt valitseb luukoes osteoblastide ja osteoklastide vahel tasakaal. (Sommerfeld & Rubin 2001; Shirotori *et al.* 2005; Ekholm 2001).

Osteoblastid. Funktsionaalselt on osteoblastid rakud, mis sekreteerivad luumaatriksis I tüüpi kollageeni, mitte-kollageenseid valke ja reguleerivad mineralisatsiooni protsessi. Morfoloogiliselt on rakud kuboidse kujuga ja asuvad luupinna lähedal koos nende prekursoritega, kus moodustavad tiheda kihi rakkudest.

Osteoblastid sõltuvad kontaktist transmembraansete proteiinide ja spetsiifiliste retseptoritega, et säilitada rakuline funktsioon ning tundlikkus metaboolsetele ja mehaanilistele stiimulitele (Sommerfeld & Rubin 2001; Shiratori *et al.* 2005).

Osteoblastide eluiga jääb vahemikku alates 3 päevast küülikutel kuni 8 nädalani inimestel. Lõpuks osa osteoblaste jäävad „lõksu“ nende endi produtseeritud maatriksisse, nende fenotüüp muutub ja nendest arenevad osteotsüüdid (Sommerfeld & Rubin 2001).

Eraldi peaks veel nimetama luu rüütrakke (*bone lining cells*), mis on inaktiivsed osteoblastid, mis katavad luu pealispinda (Ekholm 2001).

Osteoklastid on suured, mitmetuumalised rakud, millede põhifunktsiooniks on hävitada vana ja/või kahjustunud luukude niinimetatud Howship'i lakuunides. Makrofaagid ja osteoklastid pärinevad hemopoeetilisest tüvirakust. Sarnaselt makrofaagidele on osteoklastid kõrge migreerumise võimega, mitmetuumalised ja polariseeritud rakud, mis kannavad endas lüsosomaalsete ensüümide arsenalit. Osteoklastid on kõrgelt spetsialiseerunud rakud ja omavad ultrastruktuurselt mitmeid unikaalseid ehituslike eripärasid nagu pleomorfne mitokondrid, vakuoolid ja lüsoosoomid. Prootonpumbad langetavad pH osteoklasti aluses alas 2 ja 4 vahele, mille tagajärjel aktiveeruvad sekreteeritud ensüümid. Üks põhilisemaid on rauda sisaldav tartraatresistentne happeline fosfataas (TRAP), mida kasutatakse osteoklastide aktiivsuse ja diferentseerituse markerina (Ross & Pawlina 2006). Aktiveeritud osteoklast on võimeline resorbeerima 200000 μm^3 luukude/päevas, mis on võrdne 7-10 osteoblastide põlvkonna jooksul moodustatud luukoega (Sommerfeld & Rubin 2001; Teitelbaum 2007).

Luurakud ehk osteotsüüdid on haralised rakud, mis asuvad luulakuunides. Osteotsüüdid arenevad osteoblastidest, kui nad on täielikult ümbritsetud luumaterjaliga. Samas erinevad nad üksteisest nii morfoloogiliselt kui ka funktsionaalselt (Ekholm 2001).

Osteotsüüdid on kõige arvukam rakuliik luukoes. Nad on väiksemad kui osteoblastid, sisaldavad vähem organelle nagu ribosome ja endoplasmaatilist võrgustikku ning neis on tõusnud tuuma/tsütoplasma suhe. Osteotsüüt vastutab luukoe säilimise eest, nad omavad võimet sünteesida, aga vähesel määral ka resorbeerida luu maatriksit (Sommerfeld & Rubin 2001).

3.3. Luu biokeemilised markerid

3.3.1. Alkaalne fosfataas

Alkaalne fosfataas (ALP) on ensümaatilise aktiivsusega membraaniproteiin. Täiskasvanutel on kaks põhilist enamvähem võrdse osakaaluga alkaalse fosfataasi allikat – maksa endoteelirakud ja osteoblastid. Aktiveeritud osteoblasti rakumembraan on rikastatud alkaalse fosfataasiga, mis on kõrgema tasemega mineralisatsiooni alguses ja langeb protsessi käigus. Vaatamata sellele ei ole alkaalse fosfataasi osalemine mineralisatsiooni protsessis veel lõplikult selge (Äkesson 1995). Seerumi alkaalne fosfataas on segu tema erinevatest molekulaarsetest vormidest, isoensüümidest (isoE). Isoensüümide nimetused kajastavad nende päritolu: luu- (osteoblastid), maksa- (sapiteede epiteel), soole- (sooleepiteel), neeru- (tuubulite rakud) ja platsentaarne isoensüüm (platsenta rakud). Luu alkaalse fosfataasi isoensüüme saab kindlaks teha termilise denaturatsiooni teel ning määrates jääkensüümi aktiivsuse elektrofooresiga agarosgeelil (Lueng *et al.* 1993, Siigur & Ora 2006). Luu seisukohalt on totaalse alkaalse fosfataasi määramise puuduseks madal spetsiifilisus ja sensitiivsus, aga sellest hoolimata ALP näitab ära suuremad muutused luu ringluses. Lastel on enamus alkaalsest fosfataasist luulise päritoluga ja on korrelatsioonis kasvuga. Alkaalse fosfataasi aktiivsuse tõus võib olla ka füsioloogiline. Tõus esineb puberteedi kestel ja seostub kasvu spurtidega. Naistel esineb kerge tõus vanuses 30-80 ja spetsiifiline tõus menopausi ajal. Raseduse viimasel trimestril on ALP koguaktiivsus tõusnud platsentaarse isoensüümi arvel. Alkaalse fosfataasi tõusu põhjuseks võivad olla ka ravimid, mis metaboliseeritakse maksas (Äkesson 1995). Alkaalse fosfataasi kõrgeimad väärtused on sapiteede sulguse (kivi, tuumor, äge pankreatiit, hepatiit jms.) ja mõningate luuhaiguste (*M.Paget*, rahhiit, metastaasid luudes) puhul. Keskmiselt kõrgeenenud väärtusi leitakse hüperparatüreoidoosi, sarkoidoosi, müeloomi, leukeemia, amüloidooi, tuberkuloosi puhul, samuti luumurdude paranemisfaasis. Alkaalse fosfataasi aktiivsus võib olla tõusnud ka mõnedel muudel juhtudel, nagu pneumoonia, kopsuinfarkt, südamepuudulikkus, äge nefriit, samuti on lastel seoses intensiivse luude kasvuga nivoo oluliselt (kuni 5 korda) kõrgem kui täiskasvanuil. Vanematel inimestel, eriti menopausis naistel, võib ALP aktiivsus uuesti veidi tõusta, mis on seotud osteoporoosi tekkega. Aluselise fosfataasi aktiivsus võib olla väga madal hüpotüreoidoosi puhul, samuti on aktiivsus tugevasti langenud harvaesineva kaasasündinud hüpofosfataasia korral, mil puuduvad koespetsiifilised (maksa-, luu-, neeru-) isoensüümid (Lueng *et al.* 1993; Äkesson 1995).

3.3.2. Osteokaltsiin

Osteokaltsiin on mineraale siduva ekstratsellulaarse matriksi (ECM) valkude perekonna üks esindaja niinimetatud Gla-proteiin (BGP). Osteokaltsiin moodustab 15-20% mittekollageensetest valkudest ja avastati ligi 30 aastat tagasi (Äkesson 1995). Osteokaltsiin sünteesitakse osteoblastide poolt ja sünteesi stimuleerib vitamiin D, samas kui parathormoon (PTH) võib protsessi pidurdada (Ekholm 2001). Osteokaltsiin oma kohalolekuga modifitseerib aminohappe Gla-jääke, mis varustavad osteokaltsiini kõrge afiinsusega mineraalionidega nagu Ca^{2+} , mis on luu ekstratsellulaarse matriksi tähtsaks mineraalseks komponendiks. Osteokaltsiiniga saab määrata ja hinnata luukoe moodustumise ja luu ainevahetuse kiirust, samas hinnangu andmisel tuleb arvestada ka teiste biomarkeritega (Ekholm 2001). Lastel on kõrge osteokaltsiini tase kiire kasvu ajal. Lisaks esineb tõus, kui luumass jõuab tippu (Tamm *et al.* 2003). Osteokaltsiini sisaldus kõigub aasta- ja kellaajaliselt, kõrgem tase on leitud talvel ja peale keskööd, samas madalam tase esineb suvel ja lõuna paiku. Täiskasvanutel on osteokaltsiini kontsentratsioon seerumis kõrgem *Pageti* haiguse, primaarse või sekundaarse hüperparatüreoidismi, luu pahaloomuliste protsesside või luumetastaaside korral. Madal osteokaltsiini kontsentratsioon seerumis võib olla hüperöstrogeenismi, hüpötüreoidismi, hüpoparatüreoidismi ja pikaajalise kortikosteroidravi korral (Äkesson 1995; Siigur & Ora 2006).

3.3.3. Osteopontiin

Osteopontiin kuulub fosfoproteiinide hulka, mis on grupp fosforüleeritud proteiine luus, mille funktsiooniks on happelise kaltsiumi sidumine. Osteopontiini sekreteerivad osteoblastid varajases luu arengustaadiumis, mis võimaldab neil kinnituda ekstratsellulaarsele matriksile, lubades täide viia osteogeneesiks vajalikku funktsiooni. Osteopontiin on tähtis ka osteoklastide kinnitumisel luule ja nende resorptsiooni protsessis. Osteopontiini leidub erinevates mitteluulistest kudedes nagu makrofaagides, neutrofiilides (Ekholm 2001; Ross & Pawlina 2006).

3.3.4. Kollageenid

Kollageenid on ekstratsellulaarse matriksi heterogeenne proteiinide rühm, millel on tähtis strukturealne funktsioon. Kollageenid moodustavad ligi 1/3 kõigist imetajates olevatest valkudest. Nende molekulid moodustuvad kolmest polüpeptiidsest heeliksi ahelast, mis omavad glütsiini-X-Y iseloomuliku jada, kus X ja Y võib olla ükskõik milline aminohape, aga kõige tihedamini on nendeks proliin ja hüdroksüproliin (Gordon 2010). Prolini leidub

rohkelt korduvates glütsiini-proliini-X ja glütsiin-proliin-hüdrosüproliin jadades. Iseseisvad α -ahelad on vasakpoolsed, mis on keerdus ümber üksteise järgides parempoolset väändumist. Kõik teadaolevad kollageenid sisaldavad ka globulaarseid alasid (Trackman 2005).

Kollageeni geneetilises perekonnas on vähemalt 19 erinevat kollageeni tüüpi, erinevad kollageeni tüübid on nummerdatud rooma numbritega avastamise järjekorras. Kollageene võib jagada kaheks, järgides struktuurseid ja funktsionaalseid eripärasid: fibrillaarsed ja mittefibrillaarsed kollageenid (Äkesson 1995).

Fibrillaarsed kollageenid (tüüp I, II, III, V ja XI) annavad struktuuralse toe selgroogsete organitele. Mittefibrillaarsetel kollageenidel esineb väga erinev ehitus ja funktsioon, seal on nii membraaniga seotud kollageene, kui ka ühendusi loovaid kollageeni tüüpe (Ekholm 2001). Fibrillaarsete kollageenide biosünteesi, eriti I tüüpi, on väga detailselt uuritud. Biosünteesi keeruline protsess koosneb paljudest kotranslatsioonidest ja posttranslatsiooni modifikatsioonidest, millest osa on täiesti unikaalsed protsessid (Cornell 2004).

Fibrillaarse kollageeni geenid on suured (20-40 kb), mis on üle 10 korra suuremad kui funktsionaalsel mRNA-l. Nad sisaldavad 51-54 kodeerivat ühikut – eksonit, mis on omavahel eraldatud mittekodeerivate ühikutega – intronitega. Spetsiaalne mRNA on igale ahelale ning kollageen transporditakse tsütoplasmasse ning muudetakse intratsellulaarse kollageeni prekursoriks – prokollageeniks. Fibrillaarse prokollageeni molekul on kolmik-heeliks molekulmassiga ligikaudu 120 kD, milles on propeptiidid mõlemas nii N- kui ka C-terminaalses osas kõigi kolme ahela lõpus. Need molekulid sekreteeritakse ekstratsellulaarsesse maatriksisse, kus propeptidaas eemaldab nad spetsiifilise peptidaasi abil proteolüüsi teel ning kollageeni molekulid (90-100 kD) kogunevad fibrillidesse, mis omakorda stabiliseeritakse kovalentsete sidemete moodustamisega (Ekholm 2001).

Luukoes on leitud erinevaid kollageeni tüüpe. Kollageen tüüp I on peamine ehituslik komponent luus, nahas, kõõlustes ja teistes fibroossetes kudedes, tüüp II esineb põhiliselt kõhres. III tüüpi kollageen esineb koos I tüübiga pehmetes sidekudedes. V tüüpi kollageeni on leitud väikestes kogustes pehmetes sidekudedes ja luukoes. Kõhres on leitud XI tüüpi kollageeni (Ekholm 2001).

3.3.5. Kaltsitoniin

Kaltsitoniin on 32 aminohappest koosnev polüpeptiidhormoon. Kaltsitoniini sekreteerivad kilpnäärme parafollikulaarsed rakud (C-rakud) ning ta reguleerib koos parathormooni ja D-vitamiiniga kaltsiumi ja fosfori ainevahetust. Kaltsitoniini põhifunktsiooniks on Ca ladestamine luudesse ning Ca ekskretsiooni suurendamine neerude kaudu. Kaltsitoniin tõstab

Ca ja fosfaatide taset uriinis. Plasma Ca-sisalduse tõusuga suureneb kaltsitoniini sekretsioon ja väheneb PTH sekretsioon. Kaltsitoniini kasutatakse kilpnäärme medullaarse vähi ja perekondliku endokriinse hulgikasvaja (MEN2) diagnostikas ja ravi seires, mille korral on tõusunud seerumi kaltsitoniini sisaldus. Tõus esineb ka rinna- ja kopsuvähi, ning nende luumetastaaside ja feokromotsütoomi korral. Endokrinoloogilistest haigustest annab kaltsitoniini nivoo tõusu primaarne hüperparatüreos. Lisaks tõstavad sisaldust vereseerumis hüperkaltsemia, rasedus ja laktatsioon, peroraalsed rasedusvastased ravimid ning östrogeenravi (Siigur & Ora 2006).

3.3.6. Telopektiidid

C-terminaalne telopeptiid (ICTP) tekib osteoklastide mõjul luumaatriksi proteolüütilisel degradeerimisel. Sel tulemusel vabanevad tsirkulatsiooni ristsidemetega seotud ja β -aspartaat-isomeriseerunud I tüüpi kollageeni C-telopektiidide paarid. β isomerisatsiooniprotsessi, nagu ka ristsidemete moodustumist, seostatakse kollageeni küpsemisega. C-telopektiidid eritatakse ja puhastatakse tsirkulatsioonist neerude kaudu, kus osa telopeptiidide ristsidemetest degradeerub vabade ristsidemeteni - vaba püridinoliin, vaba desoksüpüridinoliin (Äkesson 1995). C-telopektiidi kasutatakse luu ainevahetuse resorptsioonifaasi hindamiseks, samuti optimaalseks ravitaktika leidmiseks ning antiresorptiivse ravi efekti jälgimiseks osteoporoosi korral. Luu ainevahetusele komplekshinnangu andmisel on soovitatav C-telopektiidide taset vaadelda koos teiste luu biomarkeritega, nagu aluselise fosfataasi luu-isoensüümi ja osteokaltsiini tasemetega. C-telopektiidide tase seerumis tõuseb luu kiirenenud resorptsiooni tagajärjel (Äkesson 1995; Siigur & Ora 2006).

4. LUUMURRUD

Luumurdude tekke põhjused võib jaotada kaheks, otseselt ja kaudselt (indirektselt) toimivate jõudude mõjul tekkinud murdudeks. Otseselt toimivateks jõududeks on näiteks kukkumine kõrgusest, tulirelva-, transpordivigastus jne ning kaudselt toimivad jõud, millisteks on painutav ja roteeriv jõud (näiteks keha pöördumine), kui jäse on fikseeritud (Haviko 2007).

Luumurrud klassifitseeritakse kolme gruppi: lahtine luumurd, kui kattekoed on vigastatud ja on olemas ühendus väliskeskkonnaga või ühendus õõnesorganiga; kinnine luumurd, kui kattekoed pole vigastatud ning ühendus väliskeskkonnaga ja õõnesorganiga puudub; komplitseeritud luumurd, kui peale luulise defekti on vigastatud ka närve, veresooni ja siseorganeid. Praktikas esineb erinevaid luumurru tüüpe: risti-, põiki-, spiraal-, kompressioonmurd ja osteoepifüseolüüs (Märtson 2008).

Ristimurd tekib tavaliselt direktse venituse või komprimeeriva jõu tagajärjel. Sarnase mehhanismiga tekib ka põikimurd, sellisel juhul on tegemist direktse komprimeeriva jõuga. Erinevus ristimurruga seisneb selles, et põikimurru puhul on lisaks tegemist 30° või suurema murrujoone kaldega. Spiraalmurd tekib aga kaudse torsioonjõu tagajärjel ning samuti murrujoone kalle on 30° või suurem. Need murrud esinevad üldjuhul kõige tihedamini. Kompressioonmurru puhul toimub sissekiildumine ning esineb tavaliselt spongioossetes luudes ja toruluude metaepifüüsides. Osteoepifüseolüüsi puhul esineb nii metafüüsi murd kui ka epifüsaarplaadi nihkumine. Epifüsaarsed vigastused haaravad tihti kasvuplaati ning võivad põhjustada luu kasvu häiret (Märtson 2008).

Luumurru diagnoosimiseks on kolm põhilist objektiivset tunnust: deformatsioon (lühenemine), krepitatsioon ja patoloogiline liikuvus. Lisaks võivad esinevad valu, turse, hematoom ja funktsiooni häire – need on subjektiivsed tunnused. Tihti esineb ka lokaalne temperatuuri tõus. Luumurdu visualiseerib kõige paremini röntgenogramm kahes suunas. Ülesvõtte lokaliseerib murru, näitab fragmentide arvu, näitab dislokatsioone, diagnoosib võimaliku eelneva patoloogia, võib näidata õhku kudedes ja võõrkehi. Tänu sellele saab valida patsiendi jaoks parima raviskeemi. Luumurdude ravi on kaks võimalust: konservatiivne või operatiivne ravi. Luumurdude esmaabis toimub verejooksu peatamine (žgutt, rõhkside), haava (aseptiline) sidumine, analgeetikumide manustamine ning jäseme immobiliseerimine. Tänapäeval on palju erinevaid immobiliseerimise võimalusi: universaalne lahas, traatlahas, venituslahas, pneumaatiline lahas, anatoomiline lahas jne. Lahastamise eesmärgiks on vältida murdunud luuosade liikumist, mis võib põhjustada nihketa murru muutumist nihkega murruks, pehmete kudede vigastusi, infektsiooni levikut ja emboolia

teket. Konservatiivse ravi puhul kasutatakse skelettekstensiooni ja kipsimmobilisatsiooni. Operatiivse ravi puhul kasutatakse välisfiksatsiooni (eriti kui esineb tugev kudede kahjustus) või sisefiksatsiooni. Sisefiksatsioonil on võimalik kasutada nii intramedullaarseid kui ka ekstramedullaarseid fiksaatoreid. Ravi valitakse vastavalt luumurrule ja kaasnevatele vigastustele, et paranemine oleks maksimaalselt kiire, funktsioon taastuks täielikult ning ei põhjustaks patsiendile suurt ebamugavust (Haviko 2007; Märtson 2008).

5. LUUMURRU REGENERATSIOON

Luukoe teke on jätkuv protsess, mis algab loote arengu ajal ja kestab elu lõpuni, kui luu remodelleerimise protsess. Vigastuste tekkel omab luu märkimisväärsed paranemisvõimet. Geneetilised mehhanismid, mis reguleerivad loote skeletogeneesi, tõenäoliselt reguleerivad ka täiskasvanute luu regeneratsiooni (Ekholm 2001).

Erinevalt pehmetest kudetest, kus paranemine toimub armkoe moodustamisega, paraneb luu uue luukoe tekkega. Murru paranemisele eelneb osteoklastide aktiveerumine, mis läbi hävitatakse vaba ja lagununud luukude. Paranemine algab kalluse moodustumisega, mis ümbritseb murru piirkonda. Kalluse funktsiooniks on stabiliseerida murru piirkond ning luua ühendus luu otste vahel (Phemister 1951). Kalluse hulk oleneb luu fragmentide stabiilsusest ja murru piirkonna verevarustusest. Luumurru paranemise kiirus sõltub selles, kui hästi moodustuvad murru tsoonis uued kapillaarid ning taastub medullaarne tsirkulatsioon (McKibbin 1978; Seivitt 1971).

Pikkade toruluude murdude ravis kirjeldatakse tavaliselt 4 faasi:

a) hematoomi tekke (põletiku) faas (Joonis 1A, 1B). Hematoom tekib koheselt peale murdu luu fragmentide vahele, koosnedes põhiliselt mesenhümaalsetest fibroblastidest ja erinevatest vere vormelementidest ja faas võib kesta 1-2 nädalat (Ekholm 2001; Marsh & Li 1999).

b) pehme kalluse tekke (proliferatiivne) faas (Joonis 1C). Seda faasi iseloomustab kõhre, uute kapillaaride teke (angiogenees). Murru piirkonnas areneb uus kapillaaride võrgustik. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud läbivad kiire diferentseerumise kondrotsüütideks ja tekib hüaliinne kõhr.

c) kõva kalluse moodustumise faas (Joonis 1D). Kollageen X tekkega teise nädala lõpus muudetakse pehme kallus kõvaks kalluseks.

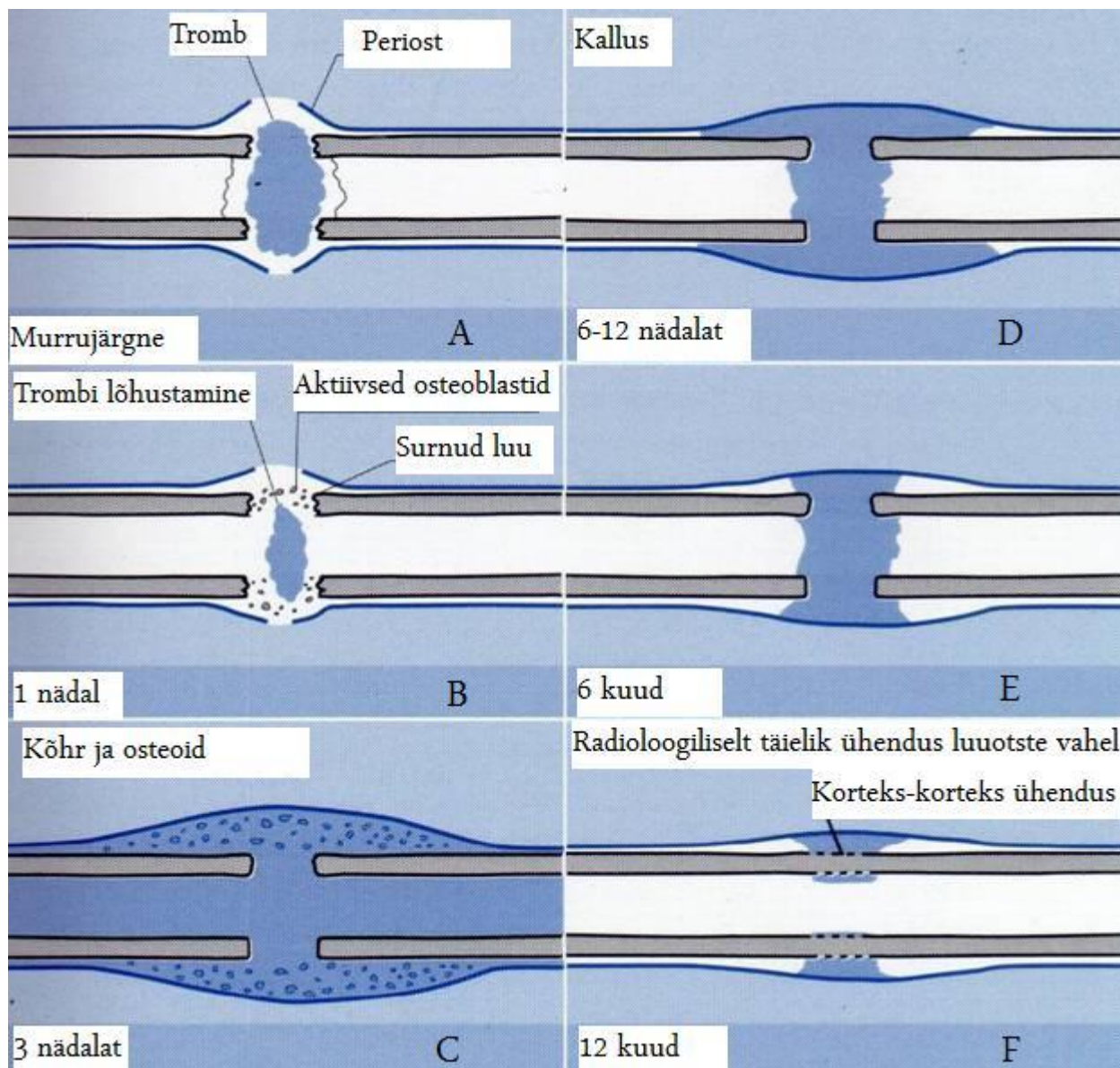
Pehme ja kõva kalluse faasid võivad kokku kesta kuni 2 kuud.

d) remodelleeriv faas (Joonis 1E, 1F). Toimub luulise kalluse ulatuslik remodelleerimine lamellaarseks luukoeks, rekonstrueeritakse luuüdi kanal ja taastatakse luu esialgne diameeter (Chao & Inoue 2003; Marsh & Li 1999).

Luumurru esialgne paranemine kestab tavaliselt 4 kuni 6 nädalat. Lõplik paranemine aga võib kesta 12 kuud ja kauemgi veel. Loomuliku luu paranemise regulatsioonis osalevad paljud faktorid - kasvu reguleerivad hormoonid, kasvufaktorid ja transkriptsioonifaktorid, mis toimivad nii lokaalselt kui ka süsteemselt. Süsteemseteks faktoriteks on endokriinsed, metaboolsed, geneetilised faktorid ja farmakoloogiline ravi. Lokaalseteks faktoriteks on kasvufaktorid, tsütokiinid ja prostaglandiinid, mida vabastatakse või toodetakse murru

piirkonnas. Arvatakse, et lokaalsete faktorite toime omab suuremat efekti luumurru paranemises kui süsteemsed faktorid (Ekholm 2001).

Joonis 1. Luumurru paranemine. [Märtson 2008]



6. LUU OSTEOSÜNTEES JA FIKSAATORID TÄNAPÄEVAL

Osteotoomia- ja luumurrufragmentide fikseerimist nimetatakse osteosünteesiks (Pöck 1989). Luumurru fiksatsiooni põhiliseks eesmärgiks on luumurru otste stabiliseerimine, et kiirendada paranemist ning tagada varajane jäseme liikuvus ja funktsioon. Murde saab ravida konservatiivselt ja operatiivselt välise- või sisemise fiksatsiooni teel (Taljanovic *et al.* 2003; Slone *et al.* 1991).

Tänapäeval on väga levinud Šveitsi AO (*Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefrage*) fiksaatorid ja instrumentarium. Instrumendid on roostevabad, korrosioonikindlad, organismi kudede poolt talutavad ning on valmistatud mehaaniliselt stabiilsest terasest (Müller *et al.* 1995).

Fragmentide fikseerimiseks on kasutusel mitmeid eri meetodeid, arvestades murru iseloomu ja ulatust ning vigastatud piirkonna eripärasid.

Traatosteosüntees. Traatfiksatsiooni rakendatakse põiki-, spiraalmurru puhul ning luutransplantaadi fikseerimisel. Luufragmente saab ühendada traatfiksatsiooni abil, mille puhul traat viiakse läbi varem läbipuuritud luumulkude või –fragmentide, ümberpõimumise teel. Traatfiksatsiooni puhul on vaja traati pingutada, sest ta peab olema tugevasti ja tihedalt vastu luud. Kui luumurd on paranenud, soovitakse traatling eemaldada, eriti lastel, sest kasvava luu puhul soonib ringjas traat sügavalt luusse ja võid tekitada uue murru (Slone *et al.* 1991).

Intramedullaarne naelastamine. Intramedullaarse naelastamise eesmärgiks on saavutada stabiilne osteosüntees, mis võimaldab varajast koormust ilma väliselt toetava ja rahuandva kipsfiksatsioonita. Intramedullaarse fiksatsiooni puhul suunatakse toruluu üdiõnde pikisuunas intramedullaarne nael, mis peab kindlalt üdiõnde kummalgi pool osteotoomia- või murrufragmenti nii, et oleks saavutatud koormuse ja liigutuste suhtes stabiilne osteosüntees. Intramedullaarset naelastamist on kasulik kasutada toruluu diafüüsi risti- ja põikimurdude ravis (Müller *et al.* 1995).

Kruviosteosüntees. Kruviosteosüntees leiab rakendust luumurru operatiivses ravis kas eraldi ravivõttena või metallplaadiga kombineerituna. Meetodi printsiip seisneb selles, et luu fragmendid komprimeerida ning üksteisega tugevasti ühendada, et oleks täidetud varajase valuvaba liigutamise nõue. Kui kruviosteosünteesil on kompressiooniprintsiip õigesti rakendatud, saadakse stabiilne osteosüntees ja võib rakendada liigutusravi. Eksisteerib kahte tüüpi kruvisid: spongioosakruvid ja kortikaalkruvid. On olemas ka asendikruvid ja kompressioonkruvid.

Plaatfiksatsioon. Tänapäeval kasutatakse ortopeedias kõige sagedamini plaatfiksatsiooni koos kruvidega. Antud fikseerimismeetodi põhieesmärgiks on saavutada maksimaalne stabiilsus. Plaatfiksaatoreid on erinevaid: kompressioon (DCP), neutralisatsioon ja sildplaat. Sildplaadi alla mõeldakse bioloogilist osteosünteesi (Wagner 2003). DCP-plaadi eesmärgiks on saavutada fragmentidevaheline kompressioon, mis vähendab fragmentide liikumisvõimalust. Viimase aja uuendusena on lukustuv kompressioonplaat (LCP), mille puhul kruvid lukustuvad plaati, millega saavutatakse veel suurem plaadi stabiilsus (Gautier & Sommer 2003).

Välisfiksatsioon. Välisfiksatsiooni näidustusteks on pehmete kudede ulatuslik kahjustus, luuinfektsioon ja hulgikilluline murd (Märtson 2008). Luufragmendid fikseeritakse varrastega, mis on jäigalt kinnitatud luu külge. Tsirkulaarse välisfiksaatori konstrueeris 1950. aastal Venemaa ortopeed G. A. Ilizarov. Leiutaja nime järgi kutsutakse seda fiksaatorit Ilizarovi aparaadiks, mis sobib hästi suurte lahtiste ja infitseerunud murdude raviks (Taljanovic 2003).

7. Dr. A. SEPPO FIKSAATOR

Alates 1953. aastast on autori poolt konstrueeritud fiksaatorit uuritud eksperimentaalselt ja kliiniliselt (Seppo 1958). Erinevate luude ja erinevate murdude jaoks on A. Seppo konstrueerinud 9 erinevat aparaatide seeriat (Seppo 1977). Keskendume reponaator-fiksaatorile, mis sarnaneb ehituselt uudse kombineeritud fiksaatoriga.

Reponaator-fiksaatorit kasutatakse toruluu murdude raviks, see kujutab endast kirurgilist seadet, mis on mõeldud nii killustunud, kui ka mittekillustunud diafüsaarsete, metafüsaarsete ja epifüsaarsete pikkade toruluude murdude raviks terve skeleti ulatuses (Seppo 1975). Fiksaator on konstrueeritud kahest metallist, mis samaaegselt koos mehhaanilise intramedullaarse fragmentide fiksatsiooniga, täidavad pidevalt galvaniseeritud elemendi funktsiooni luu kasvutsoonis ning tekitavad kontrollitud elektrokeemilise reaktsiooni, mis stimuleerib nii luu kalluse mineralisatsiooni kui ka luu troofika teket (Seppo *et al.* 1979).

Elektrokeemia. Galvaanilis-elektrokeemiliste protsesside teoorias tekitavad kaks omavahel ühendatud erinevat metalli, mis on asetatud teatud koostisega lahusesse, elektrokeemilise reaktsiooni, milles keemiline energia läheb üle elektrienergiaks (Seppo 1966; 1978). Bimetallilise galvaanilise elemendi, antud juhul aparaadi üks paar ristuvaid haarasid on paigutatud murdunud luu ühte, teine paar teise fragmenti. Haarade paarid on luuvälispinnal ühendatud juhtmuhviga, mis ei võimalda pooltelgedevahelist rotatsiooni, mingit lõtku, ega lahtiminekut keermes vahelduva koormuse all (Seppo 1977). Operatsiooni ajal viiakse fragmendid muhvi trumli pööramisega omavahel optimaalsesse kontakti. Seega on elektrokeemiline ring suletud. Aktiivsem metall saadab positiivselt laetud ioonid luukude ümbritsevasse vedelikku. Seal muutub ionide tasakaal – koevedelik saab positiivse laengu. See kutsub esile negatiivselt laetud ionide, nende hulgas ka OH-ioonide voolu aktiivse metalli tsooni. Positiivsed ioonid liiguvad aga vastupidises suunas, teise haarade paari poole. Kohtudes poolustevahelises tsoonis, neutraliseerivad positiivsed ja negatiivsed ioonid üksteist. Siin tekkinud keemilises reaktsioonis kogunevad leelisproduktid, mis tõstavad lahuse pH. Viimase tõus põhjustab omakorda vähem lahustuvate Ca–P ühendite kogunemist siia, mis soodustab luu provisoorse kalluse mineraliseerumist (Seppo 1969; 1975).

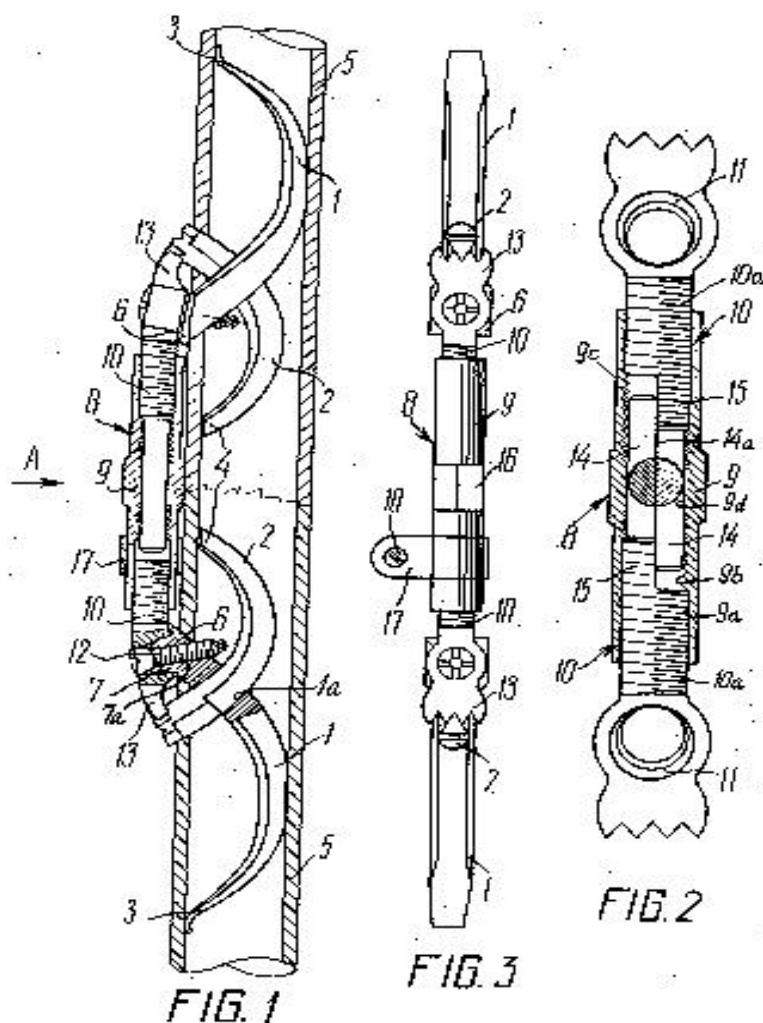
Dr. Seppo konstrueeritud fiksaator võimaldab suruda fragmendid üksteise vastu ja fikseerida need liikumatuks. Nii muutub luumurd sissekiilunud murru taoliseks või selle lähedaseks. Antud fiksaator on mõeldud lahtiste ja kinniste luumurdude fikseerimiseks ning ebaliigese operatiivseks raviks (Seppo 1958). Reponaator-fiksaatori kasutamine annab võimaluse vabastada murrupinna ja fragmendi otsad otsesest kontaktist tekitatud metalli kahjustustest

ning samas fikseerida fragmendid sellise tugevusega nii luu kui ka fiksaatori jaoks, et kipsi ega muud toetusvahendit antud jäsemele pole vaja (Seppo *et al.* 1979).

Kuna selline fiksatsioon on kindel, annab see võimaluse taastada kohe jäseme toetus- ja liikumisfunktsiooni antud jäsemel operatsioonijärgselt. Kindel fiksatsioon annab võimaluse luua murdunud jäseme fragmentide vahel luu-luu kontakt, mis on bioloogiliselt optimaalne ja paranemise poolest kõige kiirem (Seppo 1977).

1970. aasta novembris patenteeris dr. A. Seppo omanimelise fiksaatori Ühendatud Kuningriikides (patent nr. 1.334.867 ja nr. 1.335.050) ning Ameerika Ühendriikides (patent nr. 3.680.553; Seppo 1972), mida ta oli edasi arendanud võrreldes esialgse versiooniga. Dr. Seppo fiksaatori ehitus pikkade toruluude osteosünteesiks on näidatud joonisel 2.

Joonis 2. Dr. A. Seppo erinevad fiksaatorid (1972)



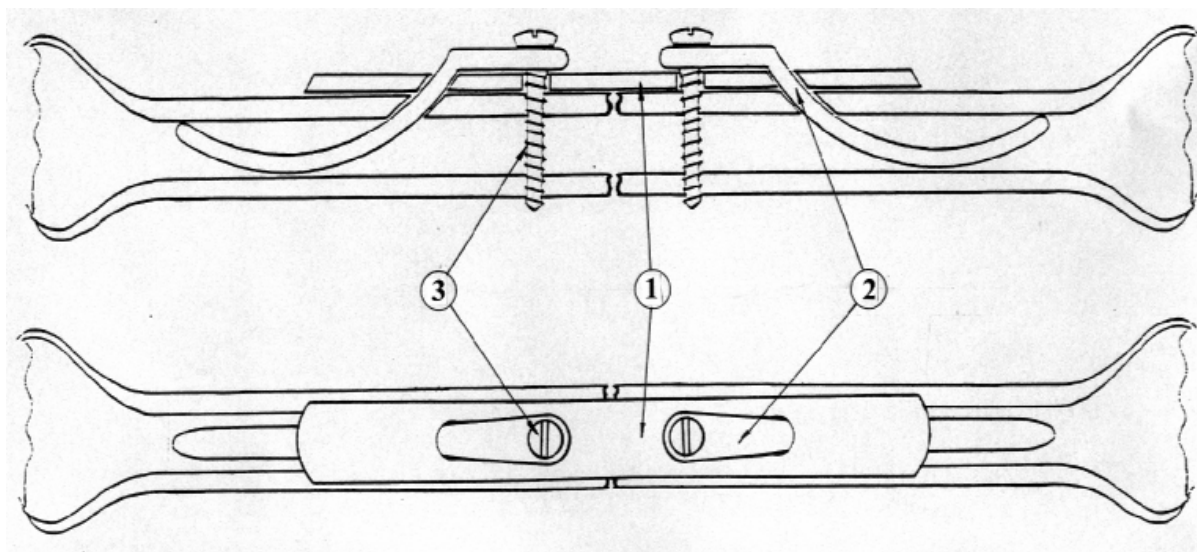
8. UUDNE KOMBINEERITUD LUUFIKSAATOR

Uudne kombineeritud fiksaator on leiutatud Tartus ning autoriteks on prof. V. Andrianov (EMÜ), dots. A. Lenzner (TÜ), prof. T. Haviko (TÜ) ning leiutis on patenteeritud 2007. aastal (European Patent N-1682008). Valminud fiksaatoril on ka eelkäija, selle leiutajaks on Eesti kirurgia ja traumatoloogia *grand old man* Arnold Seppo. Uudne kombineeritud fiksaator erineb Seppo fiksaatorist lihtsama konstruktsiooni poolest (Andrianov *et al.* 2005).

Fiksaator on konstrueeritud mehhaanika ja materjalide vastupidavuse põhiseaduse baasil arvestades jõudusid ja pingeid, mis tekivad luu ja metalli vahelistel tugialadel. Vastava tugevuse varuga kinnituse elemendid (nn. ankursüsteemid) paigaldatakse teatud kaugusel murru tsoonist, kus nad moodustavad luuüdiõõnes kolmnurkse kujuga jäiga tugiprofiili. Selline tehniline lahendus pikendab fiksaatori õlga, mis omakorda vähendab füüsilist koormust murru tsoonis ning väldib luu otste nihkumise ja rotatsiooni riski (Andrianov *et al.* 2003).

Fiksaator on valmistatud roostevabast meditsiinilisest terasest ja koosneb tugiplaadist, kahest kaarja kujuga vardast, kahest kortikaalsest luukruvist ja kahest lukustuskruvist (Joonis 3). Tugiplaat on 2,5 mm paksune ja kaarja läbilõikeprofiiliga. Plaadi pikkus on 3/5 traumeeritud luu pikkusest ja laius 1/3 luu läbimõõdust. Plaadi otstes 30 mm kaugusel on freesitud kaldkanalid 45° nurga all 5,5 mm diameetriga keskelt väljapoole. Kaarjad vardad pikkusega 40-50 mm, laius 5 mm ja paksusega 4 mm on ristlõikes ovaalse kujuga ja minimaalse koonilisusega 1,5-2 mm perifeeria suunas. Selline varraste ehitus kergendab nende eemaldamist peale luumurru paranemist. Varrast saba, mis paikneb tugiplaadi peal, on lapiku kujuga ja sama kumerusega nagu tugiplaat mõõtudega 25 x 8 x 2 mm. Varda saba otsas on kaks avaust. Üks on 4,5 mm diameetriga kortikaalkruvi jaoks, teine - 3 mm diameetriga lukustuskrugi jaoks. Mõlemad avaused on vastavuses tugiplaadi peal olevate avaustega. Nende eesmärk on varraste ja tugiplaadi üheaegne kinnitamine kruvide abil luu külge ja varda lukustamine tugiplaadi külge. Kasutatakse kortikaalset tüüpi kruve läbimõõduga 4,5 mm, mis peavad ulatuma läbi mõlematest luu korteksitest. Lukustuskrugi on tavalise metallivintlõikega 5 mm pikk ja ei tohi ulatuda luukorteksini. Antud fiksaatori mõõdud on kasutatud koerte ja lammaste opereerimisel, kuid erinevatel loomadel on fiksaatori suurus erinev (Andrianov *et al.* 2003). Tugiplaadi peal asuvate avauste vahe on standardne, mis võimaldab asendada vardaid omavahel või asendada neid teiste varrastega, millega komplekteeritakse fiksaator. Töö fiksaatoriga on tunduvalt kergem ja mugavam, kui komplektis on mitu erinevate mõõtudega tugiplaati ja kaarjat varrast.

Joonis 3. Uudse kombineeritud fiksaatori skeem (Andrianov V *et al.* 2005)



Nr. 1. Tugiplaat

Nr. 2. Kaarja kujuga varras

Nr. 3. Kortikaalne luukruvi

9. TÖÖ EESMÄRGID

1. Võrrelda morfoloogiliselt uudse kombineeritud fiksaatoriga ja plaatfiksaatoriga opereeritud loomade luukoe regeneratsiooni kulgu
2. Uurida ekstratsellulaarse maatriksi valkude (kollageen I, V), osteokaltsiini ja osteopontiini ekspressiooni moodustavas luukoes
3. Teha katseloomade tervisliku seisundi ja vere biokeemiliste näitajate monitooring

10. MATERJALID JA METOODIKA

10.1. Katseloomad

Katseloomadeks olid 7 lammast: 5 Eesti tumedapealist ja 2 Eesti valgepealist lammast. Kõik lambad olid ostetud Karula vallas (Valga maakond, Eesti) asuvast lambafarmist ning loomade orienteeruvaks vanuseks oli 4 kuud. Loomade keskmiseks kaaluks oli 35 ± 5 kg. Eksperimendi läbiviimisel arvestati TÜ ja EMÜ "Katseloomadega töötamise eeskirju", mis on vastavuses Euroopa Liidu Direktiiviga 24. novembrist 1986 (86/609/EEC). Eksperimendi läbiviimiseks on olemas Põllumajandusministeeriumi Loomkatse Läbiviimise Loakomisjoni luba (19.04.2006).

Katseloomad jaotati kaheks rühmaks: 4 lambal rakendati sääreluu eksperimentaalse murru fikseerimiseks uudset kombineeritud fiksaatorit ja 3 lambal kasutati võrdlevalt klassikalist plaatfiksaatorit.

10.2. Operatsiooni metoodika

10.2.1. Ettevalmistus operatsiooniks

Ettevalmistuse esimesel etapil püüti katseloomad, alustades operatsioonipiirkonnaga sääreluu lateraalsel küljel, seejärel kanüüli paneku piirkond esijäsemel ning viimaks kägiveeni (v. *jugularis*) piirkond kaelal. Jäsemele paigaldati kanüül ning kägiveenist võeti veri biokeemia ja immuunanaluüsi tarbeks.

10.2.2. Anesteesia

Anesteesiaks kasutati i/v Medetomidine hydrochloride 1 mg/ml (Dorbene®, Laboratorios Syva, Hispaania) 0,5 ml, mis viidi süstla abil kanüüli. Katseloom paigutati operatsioonilauale, jäsemed fikseeriti köitega operatsioonilaua külge. Järgnes katselooma intubeerimine. Anesteesiaks kasutati Komesaroff inhalatsiooni aparaati (Medical Developements, Melbourne, Austraalia). Anesteesiagaasina kasutati 2% isofuraani (*isofuranum*) (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Inglismaa) vastavalt vajadusele. Anesteesia jooksul tilgutati i/v Ringeri lahust (Ringer-Lactat, B.Braun Melsungen AG, Saksamaa) 11 ml/kg/h. Operatsiooniväli puhastati 75° etanooliga (Chemisept-G, Chemi-Pharm, Tallinn, Eesti) ning operatsiooni piirkond kaeti steriilselt.

10.2.3. Operatsioon

Enne operatsiooni algust valmistati röntgenpildi alusel vajalike mõõtmetega tugiplaat ja kaarjad lamellid. Jälgiti, et tugiplaadi profiil oleks võimalikult maksimaalselt kooskõlas

valitud katselooma sääreluu profiiliga. Operatsioon algas naha sisselõikega, mille järgselt toimus lihaste ja fastsiate (*m. ext. digiti IV pedis proprius*; *m. gastrocnemius* ja *m. flexor hallucis longus*) vahelt juurdepääsutee loomine luuni. Pärast seda toimus fiksaatori esialgne sobitamine ning tulevase „murrupiirkonna valimine”. Fiksaator kinnitati ajutiselt ning luu lõigati läbi *Gigli* saega. Pärast murru tekitamist toimus fiksaatori lõplik kinnitamine, mille käigus modifitseeriti lamellide nurka ning valiti sobivad kruvid.

Plaatfiksaatori puhul algas operatsioon samamoodi nahalõikega, aga kuna plaat on suurem kui kombineeritud fiksaatoril, siis nahalõige oli tunduvalt pikem. Edasi toimus lihaste ja fastsiate vahelt juurdepääsu loomine luuni. Edasine tegevus toimus sarnaselt kombineeritud fiksaatori paigaldamisega. Kuna plaatfiksaatoril on kuus kruvi, siis fiksaatori lõplik kinnitamine võttis rohkem aega.

Lihaste õmblemiseks kasutati VICRYL® 1, CP-1 ja nahaõmblusteks VICRYL® 1, CP-1 või *Safi I® green I* (Safil®1, Braun, Saksamaa). Ömmeldud haavale lasti Alamycin aerosooli ning antibakteriaalseks raviks süstiti procainpenicillin 300 mg/ml (Norcilliin®, Norbrook Laboratories Ltd., Põhja-Iirimaa) 5 ml i/m. Valuvaigistav ravi teostati vastavalt vajadusele kasutades s.c. Carprofen 50 mg/ml (Rimadyl®, Vericore Ltd., Dundee, Šotimaa) 2 mg/kg lähtudes katselooma kaalust. Pärast operatsiooni tehti röntgenülesvõtted *Medlink URS Veterinary Portable X-ray SP-VET-4.0* (SEDECAL, Hispaania) röntgenaparaadiga.

10.3. Vere biokeemia

Vere võtmiseks pügati lambal kägiveeni (v. *jugularis*) piirkond kaelal, mis seejärel puhastati 75° etanooliga (Chemisept-G, Chemi-Pharm, Tallinn, Eesti). Veen komprimeeriti ja veri võeti kahte kollase korgiga katsutisse – tegemist on seerumit vormelementidest eraldava plastikkatsutiga (SST- *serum separation tube*), mis sisaldab hüübimise aktivaatorit (*clot activator*) ja ka geeli, mis tsentrifuugimisel asetub vereseerumi ja vormelementide vahele, antikoagulanti katsuti ei sisalda. Võetud veri transporditi 30 minuti jooksul Tartu Ülikooli Kliinikumi (TÜK) Ühendlaborisse, kus üks katsuti läks biokeemia ja teine immunoanalüüsi jaoks. Vere võtmine toimus iga kahe nädala möödudes (14., 28., 42., ja 56. postoperatiivsel päeval). Laboris määrati aluselist fosfotaasi (U/I), osteokaltsiini (ng/ml), C-telopeptiide (ng/ml), üldvalku (g/l), CRV (mg/l), kaltsitoniini (µmol/l) ja parathormooni (µmol/l).

10.4. Röntgenoloogia

Röntgenülesvõtted tehti opereeritud loomade jäsemetest alates preoperatiivsest ajast kahe nädalase intervalliga. Ülesvõtted tehti kahes projektsioonis (otse- ja külgsprojektsioon) röntgenaparaadiga *Medlink URS Veterinary Portable X-ray SP-VET-4.0* (SEDECAL, Hispaania). Ülesvõtted tehti 1 meetri kauguselt selle portatiivse digitaalse röntgenaparaadiga ning parameetriteks on 50 kVp ja 10.0 mAs. Kassetina kasutati *AGFA CR MD 4.0 General Plate* digitaalset röntgenplaati, millelt kujutised laeti *AGFA ADC Solo Digitizer* digitaatori abil arvutisse ning kopeeriti digitaalsetele andmekandjatele.

10.5. Katseloomade tervisliku seisundi monitooring

Enne operatsiooni võeti katseloomadelt veri ja pärast operatsiooni tehti röntgenogramm. Vereanalüüse ja röntgenülesvõtteid tehti iga kahe nädala tagant, et monitoorida vere biokeemilisi muutusi ja röntgenoloogiliselt kalluse teket ning murrujoone paranemist. Lisaks jälgiti lammaste subjektiivset käitumist ja toetumist opereeritud jäsemele.

10.6. Eutanaasia

Katse lõpus sooritati katseloomade eutanaasia, mis viidi läbi kahefaasiliselt.

Esimene faas (sedatsioon) saavutati i/v 20 mg/ml Xylaxine hydrochloridum (Xsylapan®, Vetoquinol AG, Bern, Šveits) manustamisega arvestusega 0,08-0,75 ml/100 kg.

Teises faasis manustati eutaniseeriva aina i/v T61® (Embutramid 200mg + Mebezoniumiodid 50 mg + Tetracain hydroclorid 5 mg, Intervet S.A., EL) doosis 5 ml/50 kg.

10.7. Histoloogilised uuringud

Uuringuteks võeti luukoe proove kahel katseloomal biopsiana (vastavalt 2 ja 4 nädala möödudes) ning kõigil katseloomadel umbes 6 cm pikkuse fragmendina pärast eutanaasiat. Võetud koeproov dekaltsineeriti kasutades „SAKURA TDE™ 30 Decalcifier System” komplekti. Seejärel fikseeriti koetükk 10% formaliini lahuses ja sisestati parafiini automaatliinil Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr (Sakura, USA) ja sisestusliinil Microm (Saksamaa). Parafiinblokkidest lõigati rotatsioonimikrotoomil Ergostar HM 200 (Microm, Saksamaa) 4-µm paksused lõigud. Ülevaatepreparaatide valmistamiseks värviti lõike hematoksüliin-eosiin (H&E) standardse metoodika järgi.

10.7.1. Hematoksüliin & Eosiin – ülevaatevärving

Hematoksüliin-eosiin värvingu korral värvib aluselise reaktsiooniga hematoksüliin rakutuumad tumesiniselt ja happelise reaktsiooniga eosiin tsütoplasma ning rakkudevahelised struktuurid erinevates punakates ja roosakates toonides.

Protsess algab preparaadi deparafineerimisega ksülooli lahustes 2x3 minutit, seejärel 96% alkoholis 4x2 minutit, peale seda tuleb preparaati loputada jooksva kraanivee all. Järgneb värvimine Harrise hematoksüliiniga 5 minutit, loputamine kraaniveega ning diferentseerimine hapualkoholis 5 sekundi jooksul, veelkord loputamine ja hoidmine kraanivees 15-20 minutit. Edasi värvitakse eosiiniga 1 minut ning loputatakse destilleeritud veega. Järgneb veetustamise protsess – 96% alkoholiga 3x2 minutit ja ksülooliga 1x2 minutit ja 2x3 minutit. Preparaadi valmistamine lõpeb sulundamisega, selleks kasutati Eukitti (Fluka, Saksamaa).

10.7.2. Van Gieson – sidekoe värving

Van Gieson'i meetodi puhul värvib anioonsete värvide segu üks komponent kollageensed kiud ja teine tsütoplasma (kaasarvatud lihaskiud ja erütrotsüüdid). Pärast tuumade värvumist tumepruuniks raudhematoksüliiniga järgneb lõikude järelvärvimine happelises fuksiinis, diferentseerimine hapualkoholiga, mille tulemusel värvuvad kollageensed kiud punaseks (happeline fuksiin) ning tsütoplasma kollaseks. Van Gieson'i meetodi puhul on anioonsete värvide segu suhteliselt tugevalt happeline (Δ pH 1,0-2,0). Tsütoplasma ja kollageensete kiudude erineva värvumise põhjuseks on anioonsete värvide segus olevate värvide erinev partikli suurus: kollageen värvub suuremate partiklite toimetel samal ajal, kui väiksemad värvi ioonid värvivad tsütoplasma.

Protsess algab preparaadi deparafineerimisega ksülooli lahustes 2x3 minutit, siis 96% alkoholis 4x2 minutit, peale seda tuleb loputada kraanivee all. Järgneb värvimine Weigert' i hematoksüliiniga 5 minutit, siis loputamine kraanivees, diferentseerimine hapualkoholis 5 sekundi jooksul, veelkord loputamine ja hoidmine kraanivees 15-20 minutit. Edasi värvitakse pikrofuksiiniga 1 minut ning loputatakse destilleeritud veega. Järgneb veetustamise protsess – 96% alkoholiga 3x2 minutit ja ksülooliga 1x2 minutit ja 2x3 minutit. Preparaadi valmistamine lõpeb sulundamisega, selleks kasutati Eukitti (Fluka, Saksamaa).

10.7.3. Immunohistokeemia

Immunohistokeemiliselt määrati kollageen I, kollageen V, osteokaltsiini ning osteopontiini sisaldust luukoes kasutades Vectastain® Universal Elite® ABC Kit'i (Vector Laboratories, USA). Meetodi põhimõtteks on spetsiifiline antigeen-antikeha reaktsioon. Immunohistokeemilise uuringu tarbeks lõigati parafiinblokkidest 6-7 µm lõigud. Pärast deparafineerimist töödeldi lõigud 3% H₂O₂ ja metanooli lahuses (v.a. osteopontiin) ning pesti füsioloogilises lahuses puhverdatud fosfaadiga (PBS) (pH=7,4). Järgnevalt lisati lõikudele 20 minutiks blokeeriv normaalseerum, järgnevalt kaeti primaarse antikehaga, mis seostub spetsiifiliselt vastavalt uuritavale antigeenile (inkubatsioon toatemperatuuril niiskuskambris 60 min). Primaarsed antikehad olid kollageen I (lahjendus 1:100, Abcam, Inglismaa), kollageen V (lahjendus 1:100, Abcam Inglismaa), osteokaltsiin (lahjendus 1:500, Abcam, Inglismaa), osteopontiin (lahjendus 1:1000, Abcam, Inglismaa). Pärast pesemist PBS'iga (2x5 min jooksul) lisati sekundaarne antikeha (inkubatsioon toatemperatuuril niiskuskambris 30 min). Biotinüleeritud sekundaarne antikeha seostub omakorda spetsiifiliselt primaarsele antikehale. Seejärel inkubeeriti 30 minutit Vectastain® Universal Elite® ABC-AP reagentiga niiskuskambris ja pesti PBS'is 2x5 min jooksul. Avidiin/Biotinüleeritud ensüümkompleks (ABC) omakorda seostub biotinüleeritud sekundaarse antikehaga. Preparaadid kaeti ensüümsubstraadiga (DAB) ning inkubeeriti 5 minuti jooksul pimedas (fooliumiga kaetud niiskuskambris). DAB visualiseerib „antigeen – primaarne antikehasekundaarne antikeha – ABC” kompleksi. Lõpuks preparaadid pesti 2x5 min jooksul bidestilleeritud vees, värviti hematoksüliiniga (3 min), misjärel pesti 5 min jooksul destilleeritud vees. Preparaadid veetustati (tõusva kontsentratsiooniga etanoolide reas ja ksüloolis) ja sulundati Eukitt'iga (Fluka, Saksamaa). Preparaate hinnati skaalaga 0 kuni 4 (0 – reaktsioon puudub, 1 – minimaalne reaktsioon, 2 – nõrk reaktsioon, 3 – keskmine reaktsioon, 4 – tugev reaktsioon). Immunohistokeemilise uuringu negatiivne kontroll tehti primaarse antikehata. Tulemusi interpreteerisid kaks sõltumatut uurijat.

10.8. Statistiline analüüs

Andmed on väljendatud kujul keskmine±standardviga. Rühmadevahelise erinevuse statistilise tõepärasuse hindamiseks kasutati kas Student *t*-testi (vereseerumi markerite hindamisel) või Mann-Whitney *U*-testi (immunohistokeemiliste uuringute tulemuste hindamisel). Analüüs teostati programmi GraphPad Instat3 abil (GraphPad Software, Inc).

11. TULEMUSED

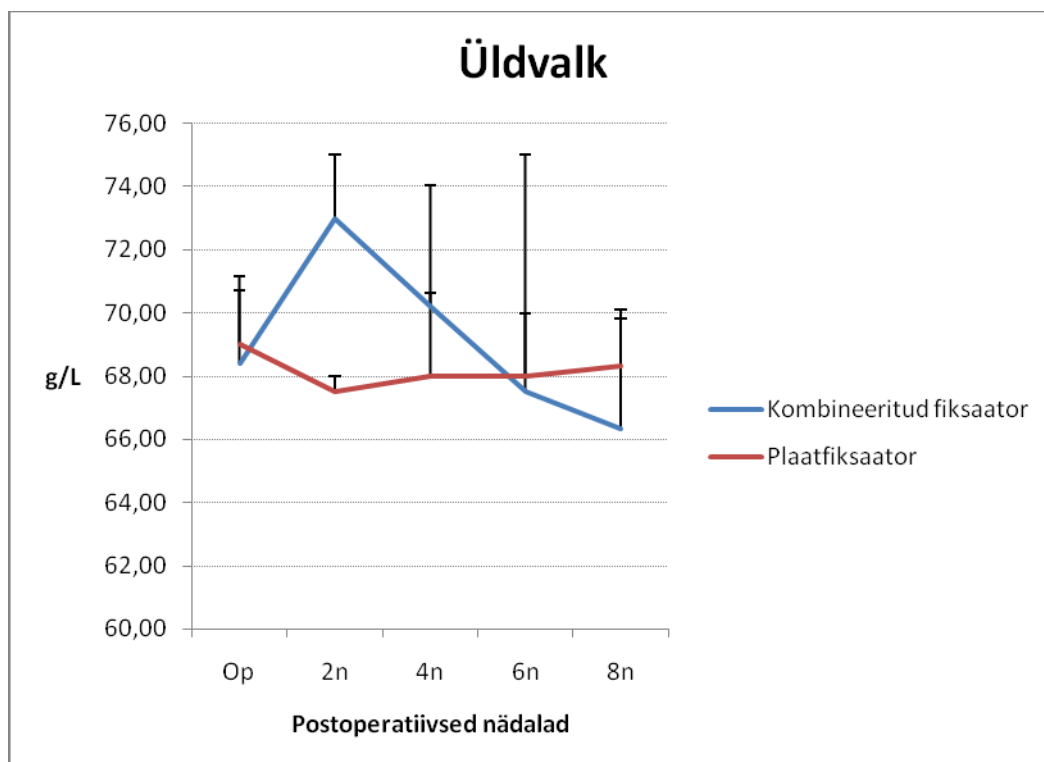
11.1. Füsioloogiline seisund

Füsioloogilist seisundit jälgiti operatsioonijärgselt, eriti suurt tähelepanu osutati opereeritud jäsemele ja üldseisundile. Uudse fiksaatori puhul toetusid lambad fikseeritud jäsemele alates esimesest postoperatiivsest päevast, mis näitab selgelt, et fiksaator oli murru kindlalt ära fikseerinud, samuti oli täheldatav jäseme hea liikuvus ja kasutatavus. Plaatfiksaatoriga lambad toetusid opereeritud jäsemele seitsmendal päeval peale operatsiooni. Üldseisund oli hea, postoperatiivselt oli säilinud hea söögiisu ja üldine aktiivsus.

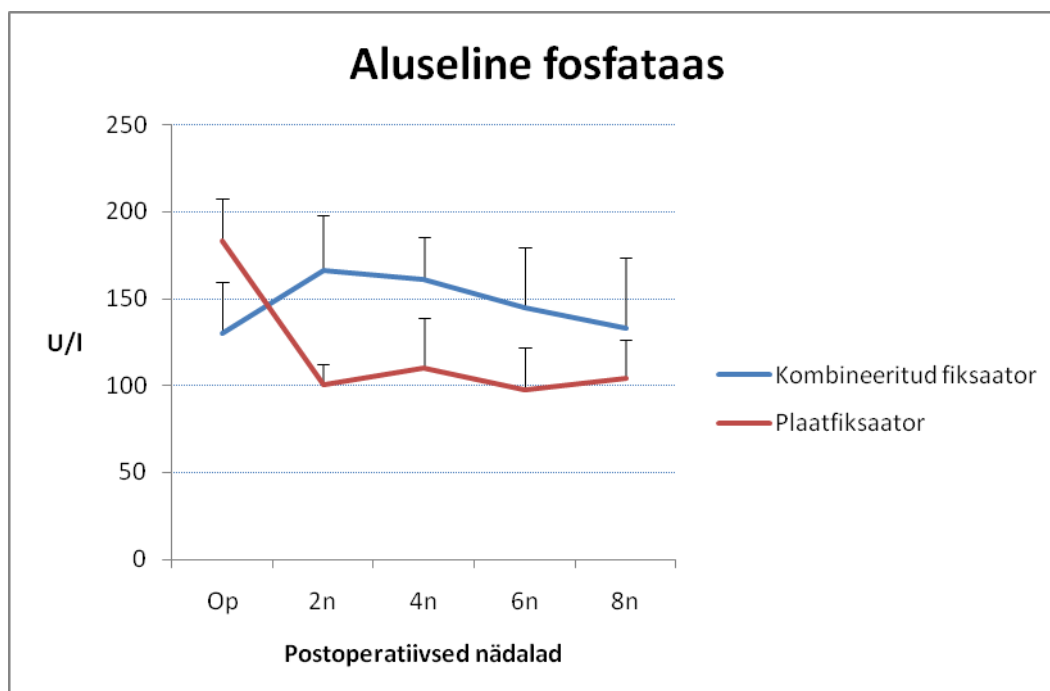
11.2. Vere biokeemia

Vereanalüüsid võeti lammastelt esmalt enne lõikust ning operatsioonijärgselt kahenädalase intervalliga. Üldvalgu (näitab valkude summaarset kontsentratsiooni) väärtused ühel lambal olid normi alumisel piiril, teistel loomadel olid tulemused referentsväärtuste vahemikus ega muutunud oluliselt mõlemas katserühmas kogu jälgimisperioodi jooksul (Joonis 4). C-reaktiivse valgu (näitab põletiku olemasolu) tase oli kõikidel loomadel kas 0 või <1 läbi kogu postoperatiivse perioodi. Aluselise fosfataasi (luustumise markeri) väärtused langesid plaatfiksaatori rühmas ja tõusid kombineeritud fiksaatoriga teisel postoperatiivsel nädalal ($P<0,05$). Plaatfiksaatori rühmas jäi aluselise fosfataasi tase järgmistel nädalatel praktiliselt samaks, aga kombineeritud fiksaatori rühmas langes mõnevõrra ja saavutas kaheksandaks nädalaks operatsioonieelse taseme (Joonis 5). C-telopeptiidi (näitab osteoklastide mõjul luumaatriksi proteolüütilisel degradeerimisel tsirkulatsiooni vabanenud, ristsidemetega seotud ja β -aspartaat-isomeriseerunud I tüüpi kollageeni taset) sisalduses esines kõikumisi aga mingeid erinevusi kahe rühma osas jälgimisperioodil ei ilmnunud (Joonis 6). Osteokaltsiini (reguleerib koos parathormooni ja D-vitamiiniga kaltsiumi ja fosfori ainevahetust) tase kummaski rühmas läbi katseperioodi oluliselt ei muutunud (Joonis 7). Parathormoon ehk paratüriin on kõrvalkilpnäärmetes sünteesitav peptiidhormoon, mille tasemed kõikusid lammastel operatsioonileelselt väärtusest $<0,32$ kuni $4,05$. Alates kuuendast postoperatiivsest nädalast langesid väärtused allapoole mõõtmispiiri ($<0,32$).

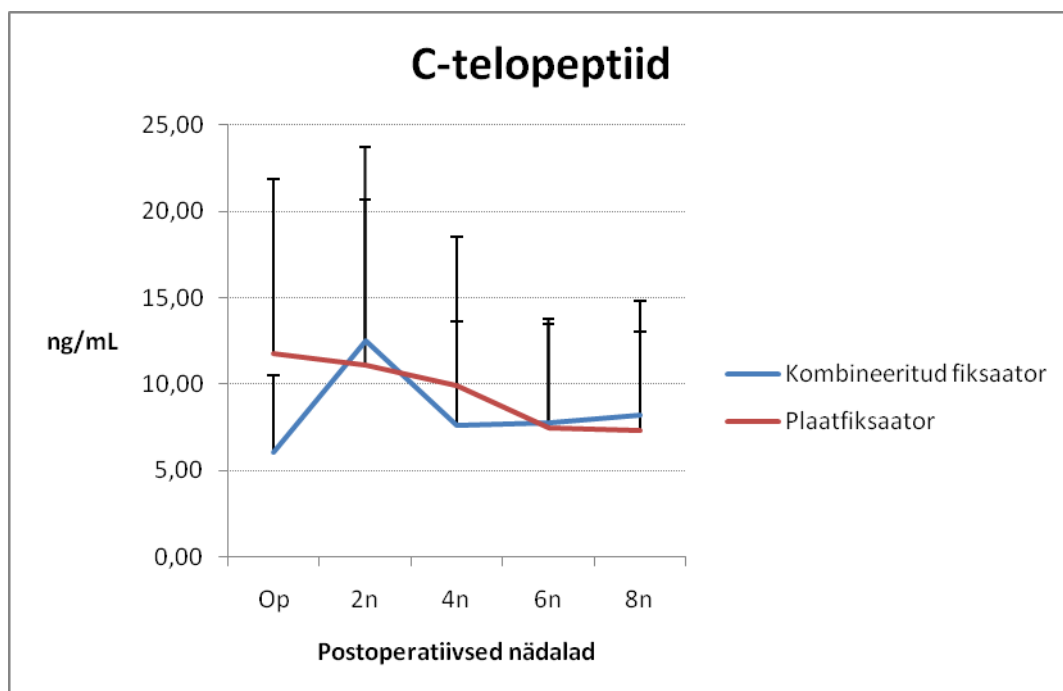
Joonis 4. Üldvalgu taseme dünaamika vereseerumis katserühmiti (Op – operatsioonipäev, 2n – teine postoperatiivne nädal (14. päev); 4n – neljas nädal (28. päev), 6n – kuues nädal (42. päev), 8n – kaheksas nädal (56. päev)).



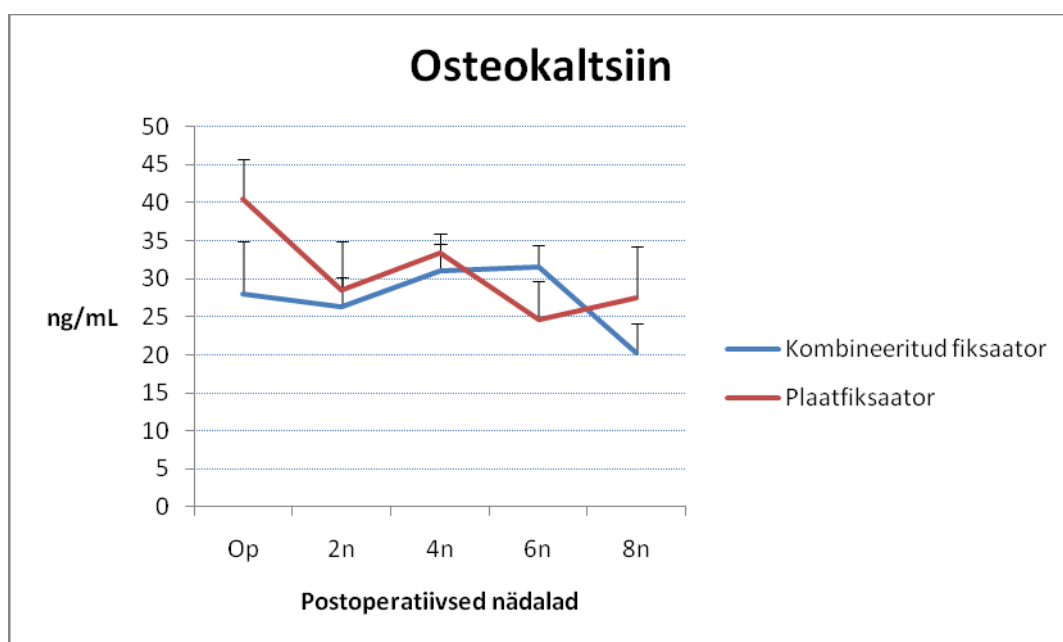
Joonis 5. Aluseline fosfataasi taseme dünaamika vereseerumis katserühmiti (Op – operatsioonipäev, 2n – teine postoperatiivne nädal (14. päev); 4n – neljas nädal (28. päev), 6n – kuues nädal (42. päev), 8n – kaheksas nädal (56. päev)). $P < 0,05$ 2n kombineeritud fiksaator vs plaatfiksaator.



Joonis 6. C-telopeptiidi taseme dünaamika vereseerumis katserühmiti (Op – operatsioonipäev, 2n – teine postoperatiivne nädal (14. päev); 4n – neljas nädal (28. päev), 6n – kuues nädal (42. päev), 8n – kaheksas nädal (56. päev)).



Joonis 7. Osteokaltsiini taseme dünaamika vereseerumis katserühmiti (Op – operatsioonipäev, 2n – teine postoperatiivne nädal (14. päev); 4n – neljas nädal (28. päev), 6n – kuues nädal (42. päev), 8n – kaheksas nädal (56. päev)).



11.3. Röntgenoloogia

Röntgenülesvõtted tehti kõigi loomade opereeritud jäsemetest (alates preoperatiivsest pildist) kahenädalase intervalliga. Ülesvõtted tehti kahes projektsioonis (kül- ja otseülesvõttena) 1 m kauguselt.

Röntgenogramm uudse fiksaatoriga fikseeritud jäsemest (Lisa 18.1., joonis 1) on järjestus vastavalt uuringu kestvusele nädalates. Esimene pilt on tehtud enne operatsiooni, teine pärast operatsiooni ning järgnevad kahenädalaste intervallidega. Varastel postoperatiivsel ülesvõtetel on selgelt näha toruluu murrujoon. Ülesvõtetel on eristatav periostaalse kalluse moodustumine teisel nädalal pärast operatsiooni ning neljandal nädalal on kalluse teke massiivne. Kuuendal nädalal on toruluu murrujoon aimatav ning kümnendal nädalal ei ole murrujoont enam näha. Hea paranemine näitab seda, et antud fiksaator on murru hästi stabiliseerinud ja ei tekita ümbritsevale koele suurt traumat. Uudse fiksaatori röntgenoloogiline uuring näitas, et kõik fiksaatori elemendid olid katse jooksul oma kohtadel, millest järeldub, et fiksaator on stabiilne ja sobib koduloomade pikkade toruluu murdude raviks. Plaatfiksaatoriga opereeritud looma röntgenogrammid on näha joonisel 2 (Lisa 18.1.). Röntgenülesvõtted on tehtud sama ajagraafiku järgi, mis eelmisel fiksaatoril. Röntgenogrammidel selgub, et kalluse moodustumine algab alles neljandast nädalast ning kuuendaks nädalaks moodustunud kalluse maht on väiksem, kui uudse kombineeritud fiksaatoriga loomadel. Katse kaheksandal nädalal on murrujoon veel selgesti jälgitav.

11.4. Histoloogia

Katse kestusega kaks nädalat

Kahe nädala möödudes katse algusest võeti biopsia ühelt uudse kombineeritud fiksaatoriga lambalt (Lisa 18.2., joonis 1A). Biopsias olid toruluu fragmendi osades luukanalid mitteoluliselt laienenud. Periosti kambiaalses kihis paiknes üks kuni kaks rida osteoblaste, fibroosne kiht oli paksenenud ja tihe. Periostaalse ja vahemise kalluse moodustasid peened luupõrgad, mis olid suuremalt osalt arenenud sidekoe baasil. Vahemises kalluses oli ülekaalus enkondraalne ossifikatsioon, kusjuures kõhre üleminek luukoeks toimus sujuvalt. Periosti poolt piiras kallust noor luukude, kuhu väätidena tungis kohev sidekude. Sügavamates kihtides leidis vahesel hulgal hüaliinset kõhrkudet. Luukoe põrgad olid erineva suurusega ja vähese mineraliseerumisega (sisaldasid noori ja suuremõõtmelisi osteotsüüte). Samuti kinnitas luu noorust rakkude-põhiaine suhte suur ülekaal rakkude kasuks.

Katsed kestusega neli nädalat

Neli nädalat kestnud eksperimendis võeti luukoe biopsia ühelt uudse kombineritud fiksaatoriga loomalt (Lisa 18.2., joonis 1B). Toruluu fragmendi osades olid luukanalid oluliselt laienenud, põletikule iseloomulikke tunnuseid katses ei esinenud. Võrreldes lühema katsega oli periost paksenenud, seda eriti fibroosse kihi osas. Fibroossele kihile liitusid väljastpoolt jämedad kollageensed kiud. Sidekoeline kallus oli uudse fiksaatoriga loomal massiivne ning rakurohke, mis viitas sellele, et tegemist oli aktiivse koega. Kalluse hulk oli suur, mis näitas, et periosti reaktsioon on liigagi aktiivne. Luulise kalluse põrgad olid küllalt massiivsed ning luukoe moodustumine toimus nii intramembranoosel kui enkondraalsel teel. Esimesel juhul paiknes ümber luupõrkade korrapärane osteoblastide ahel või siis osalesid osteogeneesis periosti rakud. Enkondraalne ossifikatsioon toimus antud katses kahel viisil. Esimesel juhul puudus selge piir hüaliinse kõhrkoe ja luukoe vahel. Sellisel luu moodustumisel jäi luupõrkade sisse rakurikka kõhrkoe saarekesi. Teisel juhul kondrotsüüdid paisusid, hävisid ning luukude hakkas arenema säilinud põhiaine ümber. Võrreldes kaks nädalat kestnud katsega oli oluliseks erinevuseks noores luus kanalite süsteemi arenemine, kus paiknesid veresooned ja sidekude. Regeneratsiooniprotsess oli edasi arenenud ning vastmoodustunud luukoes toimus kanalite süsteemi formeerumine.

Katsed kestusega kümme nädalat

Uudse kombineeritud fiksaatoriga loomadel olid toruluu fragmentides osteotsüüdid iseärasusteta ja võrreldes lühemate katsetega olid lakuunid vähem laienenud (Lisa 18.2., joonis 1C). Luukanalid olid normist laiemad, selline kanalite avarumine fragmentide otste lähedal on loomulikuks reaktsiooniks traumale. Periostaalne kallus oli reeglina väga mahukas ja sisaldas palju noort, rakurikast sidekude. Luulise kalluse koostises esineb erineva suurusega luupõrkasid, milliste maht ilmselt suureneb. Sellele viitab osteoblastide esinemine põrkade ümber. Ümberehitumine on aga vähene, kuna ei näe osteoklaste, resorptsioonilakuune, makrofaage.

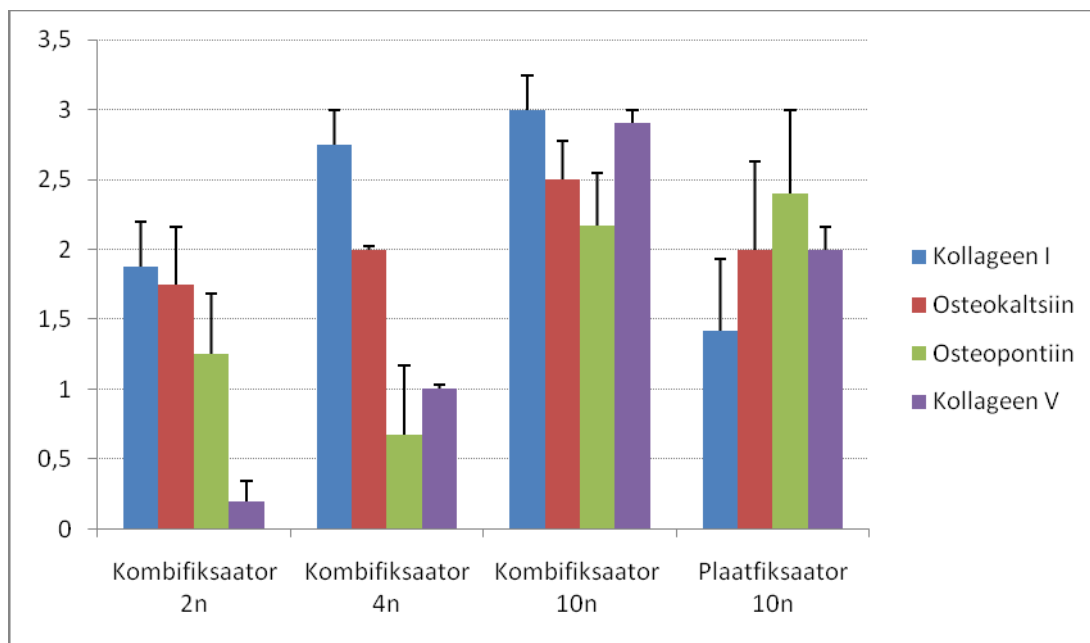
Plaatfiksaatoriga loomadel oli periostaalse kalluse hulk väiksem ning vastavalt sellele oli väiksem ka sidekoe hulk. Sidekoelises periostaalses kalluses esines väiksemaid luupõrkasid, nende ümber paiknes korrapärane osteoblastide ahel (Lisa 18.2., joonis 1D). Kõhrelises periostaalses kalluses leidis nii hüaliinset kui ka fibroosset kõhrkude. Plaatfiksaatoriga loomadel luulises kalluses prevaleeris põimikuline luukude. Seejuures olid põrgad väga ebaühtlase tugevusega, seal paiknevad osteotsüüdid olid normis ja lakuunid kitsad. Põrkade pinnal oli kohati näha osteoblastide ahelaid, mis näitas regeneratsiooni toimumist. Luulise kalluse osas paiknes põrkade vahel kohev sidekude, osteoklaste ei olnud. Luukoe põrkadesse

olid moodustunud sidekude ja veresooni sisaldavad kanalid. Luupõrkades paiknesid erinevates arenguastmetes osteotsüüdid. Vahemises ja endostaalses kalluses oli hulgaliselt sidekude, luupõrgad olid selgelt väljendunud, kuid üksikud osteoblastid paiknesid nende ümber ebakorrapäraselt.

11.5. Immunohistokeemia

Immunohistokeemiliselt uuriti kollageen I, kollageen V, osteopontiini ja osteokaltsiini sisaldust luukoe biopsiates uudse kombineeritud fiksaatori rakendamisel teisel, neljandal ja kümnendal postoperatiivsel nädalal ning plaatfiksaatori kasutamisel kümnendal postoperatiivsel nädalal (Lisa 18.2., joonised 2, 3). Kombineeritud fiksaatori rakendamisel võis kollageen I sisalduse osas jälgida tõusutendentsi – kui teisel postoperatiivsel nädalal oli kollageen I sisaldus veel madal (Lisa 18.2., joonis 2A), siis neljandal (Lisa 18.2., joonis 2B) ja eriti kümnendal nädalal oli sisaldus tõusnud (Lisa 18.2., joonis 2C). Plaatfiksaatori rakendamisel jäi kümnendal nädalal kollageen I tase (Lisa 18.2., joonis 2D) statistiliselt tõepäraselt madalamaks võrreldes loomadega, kellel kasutati kombineeritud fiksaatorit. Kollageen V tase oli kombineeritud fiksaatori rakendamisel teisel postoperatiivsel nädalal väga madal, kuid tõusis oluliselt neljandal ja eriti kümnendal postoperatiivsel nädalal (Lisa 18.2., 2E). Plaatfiksaatori kasutamisel jäi kollageen V tase kümnendal postoperatiivsel nädalal statistiliselt tõepäraselt madalamaks kui loomadel, kellel rakendati kombineeritud fiksaatorit (Lisa 18.2., joonis 2F).

Osteopontiini sisaldus oli kombineeritud fiksaatoriga loomadel suhteliselt madal nii teisel kui neljandal postoperatiivsel nädalal (Lisa 18.2., joonis 3A, 3B), kuid tase tõusis kümnendaks postoperatiivseks nädalaks ühtmoodi mõlema fiksaatori rakendamisel (Lisa 18.2., joonis 3C, 3D). Osteokaltsiini sisalduse osas väga selgeid erinevusi ei ilmnunud, küll võis kümnendal postoperatiivsel nädalal näha mõningast tõusutendentsi kombineeritud fiksaatoriga loomadel ja veidi madalamat taset plaatfiksaatoriga loomadel (Lisa 18.2., joonis 3E, 3F).



Joonis 8. Immunohistokeemiliselt määratud kollageen I, kollageen V, osteokaltsiini ja osteopontiini sisalduse muutused luumurru piirkonna biopsiates uude kombineeritud fiksaatori (kombifiksaator) ja plaatfiksaatori kasutamisel teisel (2n), neljandal (4n) ja kümnendal (10n) postoperatiivsel nädalal. Statistiliselt tõepäraseid muutused ($P < 0,05$; Mann-Whitney U -test): kollageen I - kombifiksaator 10n vs plaatfiksaator 10n; kollageen V - kombifiksaator 2n vs kombifiksaator 4n ja 10n, kombifiksaator 10n vs plaatfiksaator 10n; osteopontiin - kombifiksaator 4n vs kombifiksaator 10n.

12. ARUTELU

Käesolevas eksperimendis uuriti luukoe regeneratsiooni intensiivsust pikkade toruluude murdude korral uudse kombineeritud fiksaatori kasutamise puhul võrdlevalt plaatfiksaatoriga. Uudse fiksaatori juures kombineeritakse samaaegselt intramedullaarse ja periostaalse osteosünteesi elemente. Kombineeritud fiksaatori rakendamisel on põhieesmärgiks maksimaalselt vähendada pehmete kudede traumeerimist operatsioonil ja kindlustada loomale maksimaalselt vastupidav luufragmentide fikseerimine. Luumurdude stabiilne fiksatsioon on aga oluline tagamaks efektiivset luukoe reparatiivset regeneratsiooni (Taljanovic *et al.* 2003, Slone *et al.* 1991). Kombineeritud fiksaatori korral oli luule paigaldatav tugiplaat lühike, samal ajal intramedullaarsed vardad pikendasid fiksaatori õlga proksimaalselt ja distaalselt praktiliselt metafüüsideni. Võrreldes teiste fiksaatoritega, eriti plaatfiksatsiooniga ei nõua uudse fiksaatori paigaldamine väga ulatuslikku kirurgilist juurdepääsu, lühendades sellega operatsiooni aega ja vähendades kudede traumat, mistõttu tagatakse optimaalsed tingimused luumurru paranemiseks. Operatsiooni protokollidest selgub, et uudse kombineeritud fiksaatoriga kestsid lõikused keskmiselt 84 ± 3 minutit ja plaatfiksaatoriga 95 ± 2 minutit. Meie võrdluskatsetes nähtus, et kombineeritud fiksaatori kasutamisel toetusid loomad opereeritud jäsemele juba esimesel postoperatiivsel päeval, plaatfiksaatori kasutamisel aga alles seitsmendal päeval. Tänu väiksemale traumale kombineeritud fiksaatori paigaldamisel ja stabiilsele fiksatsioonile suudavad loomad juba esimesel operatsioonijärgsel päeval keharaskust kanda vigastatud jäsemele, mis omakorda mõjub paranemisprotsessile soodsalt. Vigastatud jäseme kiire mobiliseerimine soodustab kiiremat luumurru regeneratsiooni. Kombineeritud fiksaatori stabiilsust näitasid ka röntgenoloogilisel uuringud, kus kõikidel loomadel oli fragmentidevaheline pilu hästi jälgitav ning kõik fiksaatori elemendid olid paigas kogu katse jooksul. Operatsioonijärgselt kahenädalase intervalliga tehtud röntgenogrammidel ilmneb, et paranemisprotsess on selgelt kiirem kombineeritud fiksaatori kasutamisel võrreldes plaatfiksaatoriga. Kui kombineeritud fiksaatori korral oli kalluse moodustumine jälgitav juba teisel postoperatiivsel nädalal, kuuendal nädalal oli näha massiivne kallus ja kaheksandaks nädalaks murrujoont praktiliselt enam näha ei olnud, siis plaatfiksaatori korral oli näha kalluse moodustumist alles neljandal postoperatiivsel nädalal, kuuendal nädalal oli kalluse maht selgelt väiksem ja murrujoon oli veel hästi jälgitav kaheksandal nädalal. Samasugust dünaamikat luumurru paranemisel kombineeritud fiksaatori korral kinnitasid ka histoloogilised uuringud. Teise katsenädala lõpuks vastasid biopsia histoloogilise uuringu tulemused morfoloogilisele normile, sarnaselt sellele, mida on

kirjeldanud teised uurijad (Murray *et al.* 1996). Teise katsenädala lõpuks olid regeneratsioonile eelnev destruktsioon ja järgnev aktiivse põletiku faas läbi ning kalluses toimus intensiivne kudede moodustumine – moodustusid kiudsidekude, vähemal hulgal kõhrkude ja noor luukude. Katse neljandaks nädalaks oli regeneratsiooniprotsess edasi arenenud ning vastmoodustunud luukoes toimus kanalite süsteemi formeerumine, rakkude hulk luukoes näitas tõusutendentsi nagu on näidatud ka teistes uuringutes (McKibbin 1978). Heaks tulemuseks saab pidada põletikule iseloomulikke protsesside puudumist, mida kinnitavad ka väga madalad seerumi C-reaktiivse valguga tasemed. Kümnnendal nädalal võis kombineeritud fiksaatori korral näha kalluses kõhrkudet tagasihoidlikul hulgal, mida saab pidada positiivseks näitajaks ja mis viitab normaalsele toruloo luustumise protsessile (Ekholm 2001). Suur hulk halvasti vaskulariseeritud kõhrkude võib luua eeltingimused ebaliigese kujunemiseks (Harrison *et al.* 2003). Sarnaselt röntgenpiltidelt nähtule näitas ka histoloogiline uuring, et kümnenädaks postoperatiivseks nädalaks oli periostaalne kallus muutunud väga mahukaks, samas plaatfiksaatori kasutamisel oli kalluse maht selgelt väiksem. Sellise kalluse mahu suurenemise põhjustab ilmselt kombineeritud fiksaatori konstruktsiooniprintsiip, täpsemalt fiksaatori kinnitumise meetod luukorteksile. Nimelt kruvide kinnitamisel tekib tugiplaadi ja kaarjate lamellide vahel nn „näpitsate efekt“, mis surub luukorteksi lamellide ja plaadi vahele, mis tagab fiksatsiooni suure mehaanilise kindluse ja stabiilsuse. Lisaks annab kombineeritud fiksaator dünaamilise fiksatsiooni tänu kumeratele lamellidele luuüdikanalile, kus lamellid toetuvad kolmes punktis endostile tagades ulatusliku ja stabiilse kontakti luuga, kuid ei tekita liiga jäika fiksatsioon, mis võiks põhjustada osteolüütilisi muutusi ja peale implantaadi eemaldamist ka uusi luumurde. Samas ei ole fragmentide fiksatsioon kombineeritud fiksaatori korral täiesti regiidne, vaid tänu varraste amortisatsioonile tekib murrupiirkonnas jäsemete kasutamisel mikroliikumine, mis stimuleerib kalluse moodustamist (Jagodzinski & Krettek 2007; Goodship & Kenwright 1985). Kui luuparanemise algperioodil mikroliikumine soodustab kalluse teket, siis hilisperioodis kaltsifitseeruvast kalluses peab liikumine olema minimaalne, kuid vajalik jäikus saavutatakse loomuliku kalluse luustumise tõttu (Jagodzinski & Krettek 2007).

Vereseerumist määratud luustumisprotsessi peegeldavate markerite tase mõnevõrra varieerus, kuid sellele vaatamata näitajate dünaamika osaliselt vastas morfoloogilisele leiule. Kui seerumi üldvalgu tasemes plaatfiksaatori kasutamisel postoperatiivsetel nädalatel praktiliselt muutusi ei olnud, siis kombineeritud fiksaatori rakendamisel võis teisel postoperatiivsel nädalal näha tendentsi taseme tõusule ja langusele järgnevatel nädalatel. Näitajate suhteliselt suure hälbimise tõttu need nihked ei ole siiski statistiliselt tõepärased (Joonis 4). Küll ilmnes

selgem dünaamika erinevus seerumi aluselise fosfataasi (ALP) tasemetes. Plaatfiksaatoriga loomadel teisel postoperatiivsel nädalal ALP langes ja jäi järgnevatel nädalatel enam-vähem samale tasemele. Kombineeritud fiksaatori kasutamisel aga ALP tase tõusis teisel postoperatiivsel nädalal, seejärel tase järgnevatel nädalatel järk-järgult langes ja saavutas operatsioonieelse taseme kaheksandaks nädalaks. ALP tasemete vahe teisel postoperatiivsel nädalal erinevate fiksaatoritega loomadel on ka statistiliselt tõepärane (Joonis 5). Kuivõrd ALP peetakse luustumise intensiivsuse näitajaks, siis see marker viitab samuti intensiivsemale luu moodustumisprotsessile kombineeritud fiksaatori korral võrreldes plaatfiksaatoriga. Analooget seerumi ALP taseme tõusu lammastel eksperimentaalsete sääreluu murdude korral on näidatud 2.-4. postoperatiivse nädalani koos langusega järgnevatel nädalatel (Klein *et al.* 2004). Sarnast seerumi ALP tõusu reieluumurdude järgselt teisel ja kolmandal nädalal ning langust järgnevatel nädalatel on näidatud ka inimestel (Ikegami *et al.* 2009). Seevastu osteokaltsiini, teise seerumi luustumismarkeri (oluline eriti osteoidi mineraliseerumisel) tasemetes kahe fiksaatori võrdluses erinevusi postoperatiivsetel nädalatel ei ilmnenud (Joonis 7), kuigi mõningast langustendentsi operatsioonieelse tasemega võrreldes võis näha kaheksandaks nädalaks mõlema fiksaatori kasutamisel. Samuti ka luu resorptsiooni ja seega ka remodelleerumist peegeldava C-terminaalse telopeptiidi (ICTP) seerumi tasemetes selgeid muutusi ei ilmnenud tingituna näitajate hälbimisest (Joonis 6), kuigi esines jällegi mõningane tendents ICTP tõusule teisel postoperatiivsel nädalal kombineeritud fiksaatori kasutamisel. Väga suurt indiviidide vahelist erinevust seerumi luustumismarkerite osas lammastel on näidanud ka teised uurijad (Klein *et al.* 2004). Samuti osutus probleemiks parathormooni (PTH) seerumitasemete määramine lammastel, sest paljudel loomadel jäi see allapoole mõõtmispiiri. Kui operatsioonieelselt oli parathormooni (PTH) tase veel mõnel loomal määratav, siis hiljemalt kuuendaks operatsioonijärgseks nädalaks oli tase praktiliselt kõikidel loomadel allpool mõõtmispiiri tingituna intensiivsest luuparanemisest. Ilmselt on lammaste PTH normiväärtused oluliselt madalamad kui inimestel.

Luumurru piirkonna biopsiate immunohistokeemiliste uuringute tulemused kinnitavad erinevat luu regeneratsiooni intensiivsust kahe erineva fiksaatori kasutamisel. Nii kollageen I, mis on põhiliseks luukoe ekstratsellulaarse maatriksi komponendiks, immunohistokeemiliselt määratud tase oli suhteliselt kõrge kombineeritud fiksaatori kasutamisel juba teisel postoperatiivsel nädalal, kuid tõusis veel neljandal nädalal ja saavutas maksimaalse taseme kümnendaks nädalaks. Seevastu plaatfiksaatori korral kümnendal nädalal oli kollageen I tase oluliselt madalam võrreldes kombineeritud fiksaatoriga samal ajal (Lisa 18.2., Joonis 2C, 2D). Suhteliselt analoogne leid kollageen I-ga oli ka kollageen V osas. Kollageen V on kollageen I

kõrval teiseks, kuid oluliselt väiksemal hulgal esinevaks luumaatriksi komponendiks, mis arvatakse reguleerivat I tüüpi kollageensete fibrillide moodustamist ja orientatsiooni (Birk 2001). Kui kombineeritud fiksaatori kasutamisel teisel postoperatiivsel nädalal oli kollageen V tase veel väga madal, siis neljandal nädalal võis jälgida taseme tõusu ja kümnendaks nädalaks oli tase praktiliselt võrdne kollageen I-ga. Plaatfiksaatori kasutamisel jäi kollageen V tase analoogselt kollagen I-ga madalamaks võrreldes kombineeritud fiksaatori rakendamisega (Lisa 18.2., joonis 2F). Osteokaltsiini immunohistokeemilisel hindamisel murrupiirkonna biopsiates sarnaselt vereseerumi osteokaltsiini määramisele olulisi erinevusi postoperatiivsetel nädalatel kombineeritud fiksaatori kasutamisel ei ilmnenu. Samuti ei olnud osteokaltsiini tase plaatfiksaatori kasutamisel oluliselt madalam kümnendal postoperatiivsel nädalal (Lisa 18.2., joonis 3E) võrreldes kombineeritud fiksaatori rakendamisega (Lisa 18.2., joonis 3F). Seevastu osteopontiini sisalduse dünaamikas ilmnis teatud nihkeid. Osteopontiin on üheks põhiliseks luukoe ekstratsellulaarse matriksi mitte-kollageenseks valguks, mille kõrgeenenud ekspressiooni on näidatud luumurdude paranemise mineraliseerumise ja remodelleerumise faasis (Yamazaki *et al.* 1999). Ka meie uurimuses ilmnis osteopontiini taseme tõus kombineeritud fiksaatori kasutamisel kümnendal postoperatiivsel nädalal võrreldes neljanda nädalaga. Seejuures kümnendal nädalal oli osteopontiini tase võrreldav nii plaatfiksaatori kui kombineeritud fiksaatori kasutamisel (Lisa 18.2., joonis 3C, 3D). Sarnast osteopontiini, aga ka osteokaltsiini taseme tõusu on eksperimendetaalsete reieluumurdude paranemispäikkonnas näidatud kombineeritud fiksaatori kasutamisel ka küülikutel kaheksandal postoperatiivsel nädalal (Andrianov *et al.* 2007).

Kokkuvõtlikult saab antud uurimuse tulemuste kohta öelda, et uudne kombineeritud fiksaator, mis rakendab nii intramedullarse kui periostaalse osteosünteesi elemente ületab efektiivsusest plaatfiksaatorit pikkade toruluude eksperimentaalsete murdude ravil lammastel. Röntgenoloogilised, histoloogilised ja immunohistokeemilised uuringud ning osalt ka vereseerumi markerid näitavad, et kombineeritud fiksaatori kasutamisel on luu regeneratsioon oluliselt kiirem ja loomad hakkavad oluliselt varem kandma keharaskust vigastatud jalale. Seega kinnitavad eksperimendid lammastel tulemusi, mis on saadud väiksematel loomadel, kus uudset kombineeritud fiksaatorit rakendati edukalt luumurdude raviks nii küülikutel kui koertel (Andrianov *et al.* 2007).

13. JÄRELDUSED

1. Uudse kombineeritud luufiksaatori paigaldamine ja eemaldamine on lihtne, mistõttu pehmete kudede trauma on võrreldes plaatfiksaatori rakendamisega oluliselt väiksem.
2. Kombineeritud fiksaatori kasutamisel koormavad loomad keharaskust vigastatud jalale juba esimesel postoperatiivsel päeval, plaatfiksaatori kasutamisel aga alles seitsmendal päeval.
3. Uudse kombineeritud fiksaatori kasutamisel on võrreldes plaatfiksaatoriga luuregeneratsioon intensiivsem, mida kinnitavad nii röntgenoloogilised, histoloogilised ja immunohistokeemilised uuringud ning vereseerumi markerite määramised. Kombineeritud fiksaatori kasutamisel moodustub oluliselt massiivsem kõrge kollageen I ja V sisaldusega kallus. Vereseerumi markeritest näitab aluselise fosfataasi taseme tõus samuti intensiivsemat luu moodustumisprotsessi kombineeritud fiksaatori korral võrreldes plaatfiksaatoriga.
4. Uudne kombineeritud fiksaator, mis rakendab nii intramedullaarse kui periostaalse osteosünteesi elemente ületab efektiivsuselt plaatfiksaatorit pikkade toruluude murdude ravis.

14. KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti lammastel võrdlevalt uudse kombineeritud fiksaatori ja traditsioonilise plaatfiksaatori efektiivsust eksperimentaalsete sääreluumurdude ravis. Meie eksperimendis kasutatud uudne luu fikseerimise meetodika lubab intramedullaarse ja periostaalse osteosünteesi kombineerimisel suurendada fiksaatori õlga, mis võimaldab vähendada koormust luumurru piirkonnas, samas tagades luufragmentide stabiilse fiksatsiooni. Samuti vähendab uue meetodika rakendamine oluliselt pehmete kudede traumeerimist ja lühendab operatsiooni aega, sest kombineeritud fiksaatori paigaldamine ei nõua väga ulatusliku kirurgilise juurdepääsu rajamist. Luumurru regeneratsiooni dünaamika hindamiseks teostati kahenädalase intervalliga murrupiirkonnast röntgenülevõtteid ning vereseerumist määrati luustumisprotsessi peegeldavaid markereid (aluseline fosfataas, osteokaltsiin, C-telopeptiid, parathormoon). Lisaks uuriti histoloogiliselt murrupiirkonna biopsiaid ja määrati immunohistokeemiliselt ekstratsellulaarse maatriksi komponente (kollageen I ja V, osteokaltsiin, osteopontiin). Kui kombineeritud fiksaatori kasutamisel hakkasid loomad opereeritud jäset kasutama juba esimesel postoperatiivsel päeval, siis plaatfiksaatori korral toimus see alles seitsmendal päeval. Röntgenoloogilisel uuringul oli jälgitav, et kõikidel loomadel olid kombineeritud fiksaatori elemendid paigas kogu katse jooksul. Teise katsenädala lõpuks oli regeneratsiooni kaks etappi (destruktsioon ja aktiivne põletik) lõppenud ja kalluses toimus intensiivne kiudsidekoe, vähemal hulgal kõhrkoe ja noore luukoe moodustumine. Katse neljandaks nädalaks oli vastmoodustunud luukoes toimunud kanalite süsteemi formeerumine ja rakkude hulga suurenemine. Katse lõpus näitas röntgenoloogiline uuring, et luumurrud olid kombineeritud fiksaatori kasutamisel täielikult paranenud. Heaks tulemuseks saab pidada põletikule iseloomulike protsesside puudumist ja tagasihoidlikku kõhrkoe hulka kalluses, mis viitab normaalsele luustumisprotsessile. Vereseerumi markerite osas esines suuri hälvimisi indiviidide vahel, mistõttu informatiivseks osutusid ainult aluseline fosfataas muutused. Luustumise intensiivsust näitava aluseline fosfataasi tase tõusis kombineeritud fiksaatori kasutamisel teisel postoperatiivsel nädalal, samas plaatfiksaatori korral tase langes. Immunohistokeemiliselt määratud kollageen I ja V hulk suurenes kombineeritud fiksaatori kasutamisel postoperatiivsetel nädalatel saavutades maksimumtaseme kümnendaks nädalaks. Plaatfiksaatori korral jäi mõlema määratud kollageeni tase oluliselt madalamaks. Kui osteokaltsiini sisalduse osas selgeid erinevusi ei ilmnenud, siis osteopontiini tase tõusis kümnendaks nädalaks nii kombineeritud kui plaatfiksaatori kasutamisel.

Antud uurimuse alusel saab järeldada, et uudne kombineeritud fiksaator on efektiivne pikkade toruluude diafüsaarsete murdude raviks väikeloomadel, seda eeskätt kirurgilise kasutuse poolest. Samas vajaksid põhjalikud järeldused fiksaatori efektiivsuse kohta suuremat ja ulatuslikumat eksperimentaalset uuringut.

15. SUMMARY

Comparison of a new fixator with plate fixator in the treatment of tubular bone fractures: an experimental morphological study

The thesis comparatively explores the efficacy of the innovative rod-through-plate fixator and the traditional plate fixator in the treatment of experimental tibia fractures. The new bone fixation method used in our experiment allows, by combining the intramedullary and periosteal osteosynthesis, to lengthen the shoulder of the fixator, thus enabling the reduction of pressure in the fracture area and, at the same time, ensuring the stable fixation of bone fragments. In addition, the implementation of the new method significantly reduces the traumatisation of soft tissues as well as the length of operation, because the installation of the rod-through-plate fixator does not require extensive surgical access.

In order to evaluate the dynamics of fracture regeneration, radiographs were taken of the fracture area at two-week intervals and bone formation markers (alkaline phosphatase, osteocalcin, C-telopeptide, parathormone) in the blood serum were identified. Moreover, biopsies of the fracture area were also histologically examined and the components (collagen I and V, osteocalcin, osteopontin) of extracellular matrix were immunohistochemically determined. The use of the rod-through-plate fixator enabled animals to start using the operated limb already on the first post-operative day, whereas in the case of the plate fixator, the ability developed only on the seventh day.

It could be observed during the radiographical examination that in case of all animals, the elements of the rod-through-plate fixator remained in place throughout the entire experiment. By the end of the second experimental week, the two regeneration stages (destruction and active inflammation) had ended and intensive fibrous connective tissue formation took place in the callus, to a lesser extent also the formation of cartilage tissue and new bone tissue. By the fourth experimental week, the formation of the canal system and increase in the amount of cells had occurred in the newly regenerated bone tissue. At the end of the experiment, the radiographical examination demonstrated that bone fractures had completely healed during the use of the rod-through-plate fixator. Positive results include the absence of processes characteristic of inflammation and the moderate amount of cartilage tissue in the callus, indicating the normal process of ossification. Significant deviations between individual animals occurred in the blood serum markers and thus, only changes in the alkaline phosphatase proved informative. The use of the rod-through-plate fixator led to an increase in

the level of alkaline phosphatase, which indicates the intensity of ossification, whereas in the case of the plate fixator, the level dropped. The amount of collagen I and V also increased in the case of the rod-through-plate fixator during postoperative weeks, achieving the maximum level by the tenth week. In the case of the plate fixator, both collagen levels remained remarkably lower. Although no clear differences occurred in the content of osteocalcin, the level of osteopontin increased by the tenth week both in the use of the rod-through-plate and plate fixator.

The initial conclusions that can be drawn based on the experiment confirm the efficacy of the new rod-through-plate fixator in the treatment of diaphyseal fractures of long tubular bones in small animals, especially with regard to its surgical use. However, comprehensive conclusions on the efficacy of the rod-through-plate fixator require a larger number of experimental animals.

16. KASUTATUD KIRJANDUS

1. Andrianov V., Lenzner A., Roosaar P., Arend A., Aunapuu M. (2007) Rod-through-plate fixator for long bone fractures: A morphological study on rabbits. *Scan. J. Lab. Anim. Sci.* **34**, 159-166.
2. Andrianov V., Tralman G., Hõim R., Haviko T., Lenzner A., Pääsuke M., Arend A., Aunapuu M. (2007) Rod-through-plate fixation of canine diaphyseal fractures. *VCOT* **20**, 308-311.
3. Andrianov V., Lenzner A., Haviko T. (2005) A fixator and method for repairing of long bone fractures. World Intellectual Property Organization. International Publication Number: WO 2005/044121 A1.
4. Andrianov V., Hõim R., Tralman G., Haviko T., Lenzner A., Lehtla A. (2003) Pikkade toruluude murdude fragmentide ühendamine kombineeritud metallosteosünteesi meetodil. *J. Agricult. Sci.* **XIV**, 144-151.
5. Arend Ü., Kärner J., Kübar H., Pöldvere K. (1994) Üldhistoloogia. Valgus, Tallinn.
6. Beasley A.W. (1982) The origins of orthopaedics. *J. R. Soc. Med.* **75**, 648-655 .
7. Beasley A.W. Orthopaedics: evolution of the speciality. (1986). *J. R. Soc. Med.* **79**, 607-610.
8. Birk D.E. (2001) Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* **32**, 223-237.
9. Chao E.Y.S., Inoue N. (2003) Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur. Cell. Mater.* **6**, 72-85.
10. Cornell C.N. (2004) Osteobiologics. *Bull. Hosp. Jt. Dis.* **62**, 13-17.
11. Ekholm E. (2001) Bone repair: an experimental study on factors affecting the healing and the callus size. Turku. Turun yliopisto. 12-17, 27-29.
12. Gautier E., Sommer C. (2003) Guidelines for the clinical application of the LCP. *Injury.* **34**, B43-54.
13. Goodship A.E., Kenwright J. (1985) The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J. Bone Joint Surg. Br.* **67**, 650-655.
14. Gordon M. K., Hahn R. A. (2010) Collagens. *Cell Tissue Res.* **339**, 247-257.
15. Harrison L.J., Cunningham J.L., Stromberg L., Goodship A.E. (2003) Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J. Orthop. Trauma.* **17**, 11-21.

16. Haviko T. (2007) Traumatoloogia loengud III kursusele. https://www.is.ut.ee/pls/ois_sso/!tere.tulemast.
17. Ikegami S., Kamimura M., Nakagawa H., Takahara K., Hashidate H., Uchiyama S., Kato H. (2009) Comparison in bone turnover markers during early healing of femoral neck fracture and trochanteric fracture in elderly patients. *Orthopedic. Reviews.* **1**, 50-55.
18. Jagodzinski M., Krettek C. (2007) Effect of mechanical stability on fracture healing – an update. *Injury.* **238**, S3-10.
19. Klein P., Bail H.J., Schell H., Michel R., Amthauer H., Bragulla H., Duda G.N. (2004) Are bone turnover markers capable of predicting callus consolidation during bone healing? *Calcif. Tissue. Int.* **75**, 40-49.
20. Leeson C.R., Leeson T.S., Paparo A.A. (1985) Textbook of histology. Fifth edition. *W.B. Saunders Company.* 11-17; 131-146.
21. Lueng K.S., Fung K.P., Sher A.H.L., Li C.K., Lee K.M. (1993) Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **2**, 288-292.
22. Marsh D.R., Li G. (1999) The biology of fracture healing: optimising outcome. *Br. Med. Bull.* **55**, 856-869.
23. McKibbin B. (1978) The Biology of Fracture Healing in Long Bones. *J. Bone. Joint. Surg.* **60**, 150-162.
24. Murray D.W., Wilson-MacDonald J., Morscher E., Rahn B.A., Käslin M. (1996) Bone growth and remodelling after fracture. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **78**, 42-50.
25. Märtson A. (2008). Traumatoloogia loengud III kursusele. https://www.is.ut.ee/pls/ois_sso/!tere.tulemast.
26. Müller M. E., Allgöwer M., Schneider R., Willenegger H (1995). Manual of Internal Fixation. Techniques Recommended by the AO-ASIF Group. Third Edition, Expanded and Completely Revised. Springer-Verlag. 97, 106-108, 291-292, 332-346.
27. Pheemister D.B. (1951) Biological principles in the healing of fractures and their bearing treatment. *Ann. Surg.* **133**, 433-446.
28. Põkk V. (1989) Luuoperatsioonid. Tartu. 33-47.
29. Ross H.M., Pawlina W. (2006) Histology A text and atlas. With correlated cell and molecular biology. Fifth edition. *Lippincott Williams & Wilkins*; 1-14; 202-237.
30. Seppo A. (1958) Lahtiste ja kinniste toruluude murdude osteosüntees autori fiksaatori abil. *Nõukogude Eesti Tervishoid.* **5**, 52-54.

31. Seppo A. (1966) Biomechanical study in metal osteosynthesis of epiphyseal and metaphyseal fractures. *Ortop Travmatol Protez.* **27**, 53-60.
32. Seppo A. (1969) Reieluu proksimaalse osa tugevustopograafia ja metalne osteosüntees. *Nõukogude Eesti Tervishoid.* **2**, 91-95.
33. Seppo A. (1972) Fixing apparatus for osteosynthesis of fractures of long tubular bones. United States Patent 3.680.553.
34. Seppo A. (1975) Metallic osteosynthesis of bone fractures based on the topography of bone resistance. *Perioodika.* Tallinn 7-14, 68-76.
35. Seppo A. (1977) Tugevusõpetus, elektrokeemia ja luumurrud. *Tehnika ja tootmine.* **10**, 554-558.
36. Seppo A. (1978) Металлический остеосинтез переломов костей на основе точных клинико-технических наук. *Периодика.* Tallinn, 8-13, 66-72.
37. Seppo A., Ernits T., Mill H., Mõttus J., Seppo T., Truupõld U., Yuzbashev G. (1979). The reponator-fixator of dr. A. Seppo for osteosynthesis of fractures of long tubular bones. – Лечение переломов костей и ожогов. Материалы симпозиума. – Tallinn: Valgus 3-14.
38. Sevitt S. (1971) The healing of fractures of the lower end of the radius. A histological and angiographic study. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* **3**, 519-531.
39. Shirotori K., Matsuzuka K., Koike Y., Murakami S., Shimono M., Inoue T. (2005) Bone formation in β -tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA. *Biomed. Res.* **26**, 51-59.
40. Siigur U., Ora E. (2006) Ühendlabori käsiraamat võrgus.
<http://www.kliinikum.ee/yhendlabor/kasiraamat.htm> (versioon 24.01.08).
41. Slone R.M., Heare M.M., Vander Griend R.A., Montgomery W.J. (1991) Orthopedic Fixation Devices. *Radio. Graphics.* **11**, 823-847.
42. Sommer C., Gautier E., Müller M., Helfet D.L., Wagner M. (2003) First clinical results of the Locking Compression Plate (LCP). *Injury.* **34**, B43-54.
43. Sommerfeldt D.W., Rubin C.T. (2001) Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur. Spine. J.* **10**, S86-95.
44. Taljanovic M.S., Jones M.D., Ruth J.T., Benjamin J.B., Sheppard J.E., Hunter T.B. (2003) Fracture Fixation. *RadioGraphics.* **23**, 1569-1590.

45. Tamm A., Leedo S., Zemtsovskaja G., Ramm M., Pastik M., Kirss F., Lintrop M., Lember M. (2003) Luu ainevahetuse biokeemilised markerid Eesti fertiilses eas ja postmenopausi perioodis naistel. *Eesti Arst.* **82**, 270-277.
46. Teitelbaum S.L. (2007) Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *Am J Pathol.* **170**, 427-435.
47. Trackman P.C. (2005) Diverse Biological Functions of Extracellular Collagen Processing Enzymes. *J. Cell Biochem.* **96**, 927-937.
48. Wagner M. (2003) General principles for the clinical use of the LCP. *Injury.* **34**, B31-42.
49. Yamazaki M., Nakajima F., Ogasawara A., Moriya H., Majeska R.J., Einhorn T.A. (1999) Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. *J. Bone Joint. Surg. Br.* **81**, 508-515.
50. Åkesson K. (1995) Fracture and Biochemical Markers of Bone Metabolism. University of Lund, Department of Orthopaedics, Malmö General Hospital, Sweden, 10-16, 18-19.

17. TÄNUAVALDUSED

Töö on valminud Tartu Ülikooli arstiteaduskonna anatoomia instituudis histoloogia töögrupis ajavahemikul 2007-2010.a. Teadustööd finantseeriti ETF grantidest 7147, 7301 ning sihtfinantseeritavast teemast 0182688s05.

Täna projekt juht, juhendaja dotsent Marina Aunapuud ja juhendajat professor Andres Arendit igakülgse abi ja toetuse eest. Arstiteaduse õpingute kõrvalt oli väga huvitav, samas aga raske osaleda teaduslikus projektis. Täna Teid, et võimaldasite osaleda suuliste ja stendettekannetega mitmel rahvusvahelisel konverentsil.

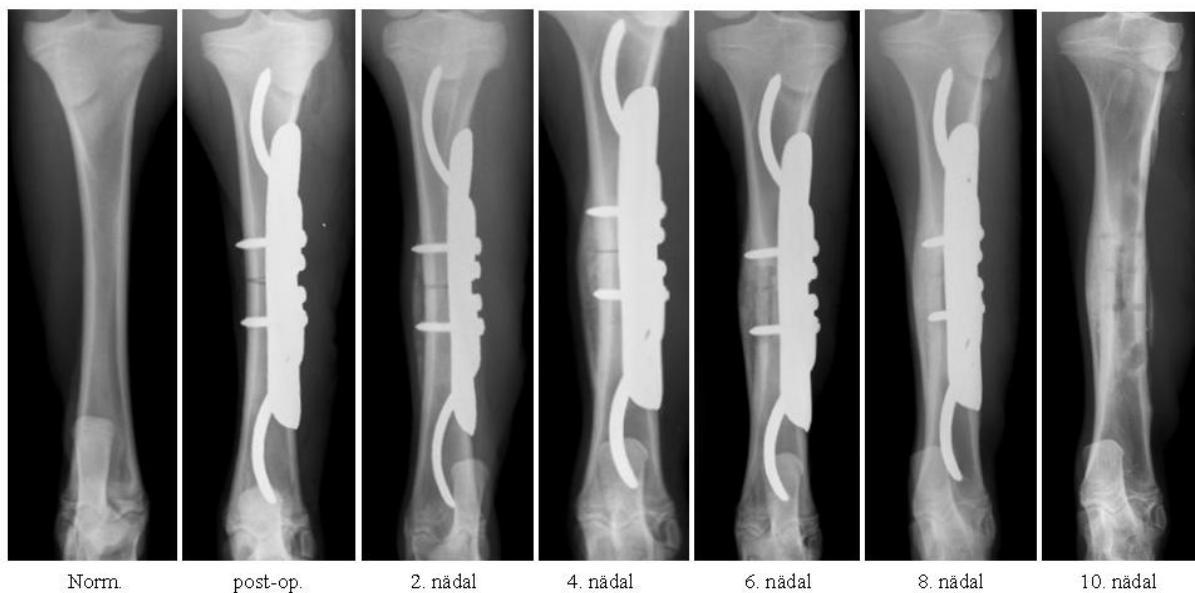
Täna juhendajat EMÜ professorit Vladimir Andrianovit.

Täna kursusekaaslaste Kalev Nõupuud, Piret Männikut ja Ragnar Toomas Kiburit, kellega koos osalesime selles eksperimendis.

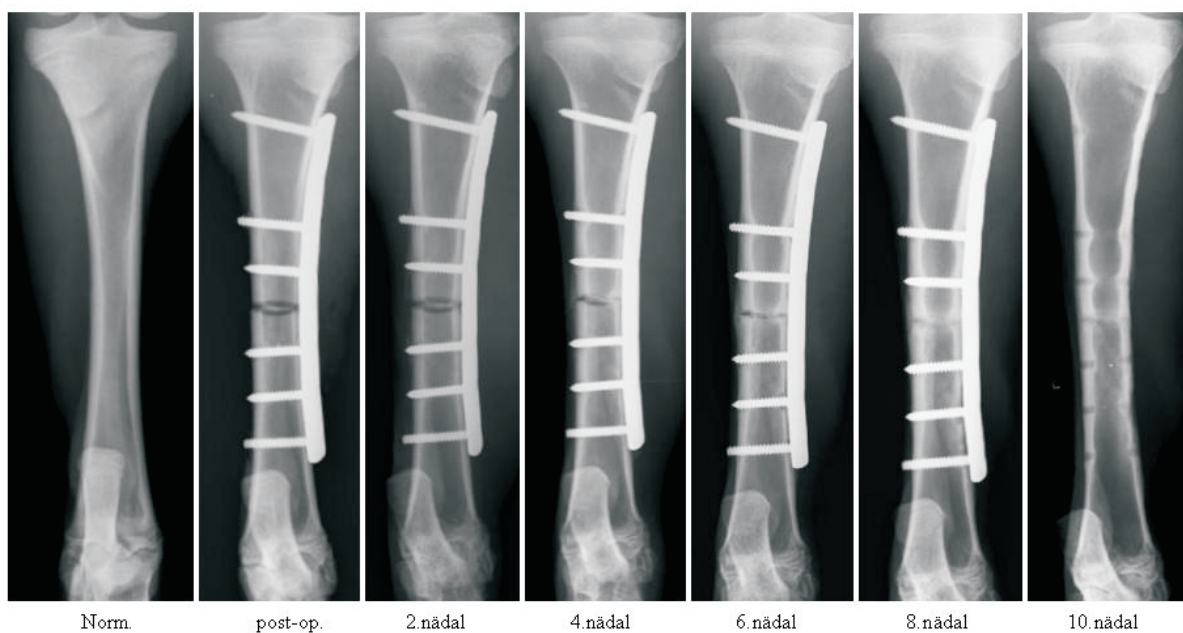
Täna oma perekonda toetuse ja teisi sugulasi igakülgse toetuse ja abi eest.

18. LISAD

18.1. Röntgenoloogia

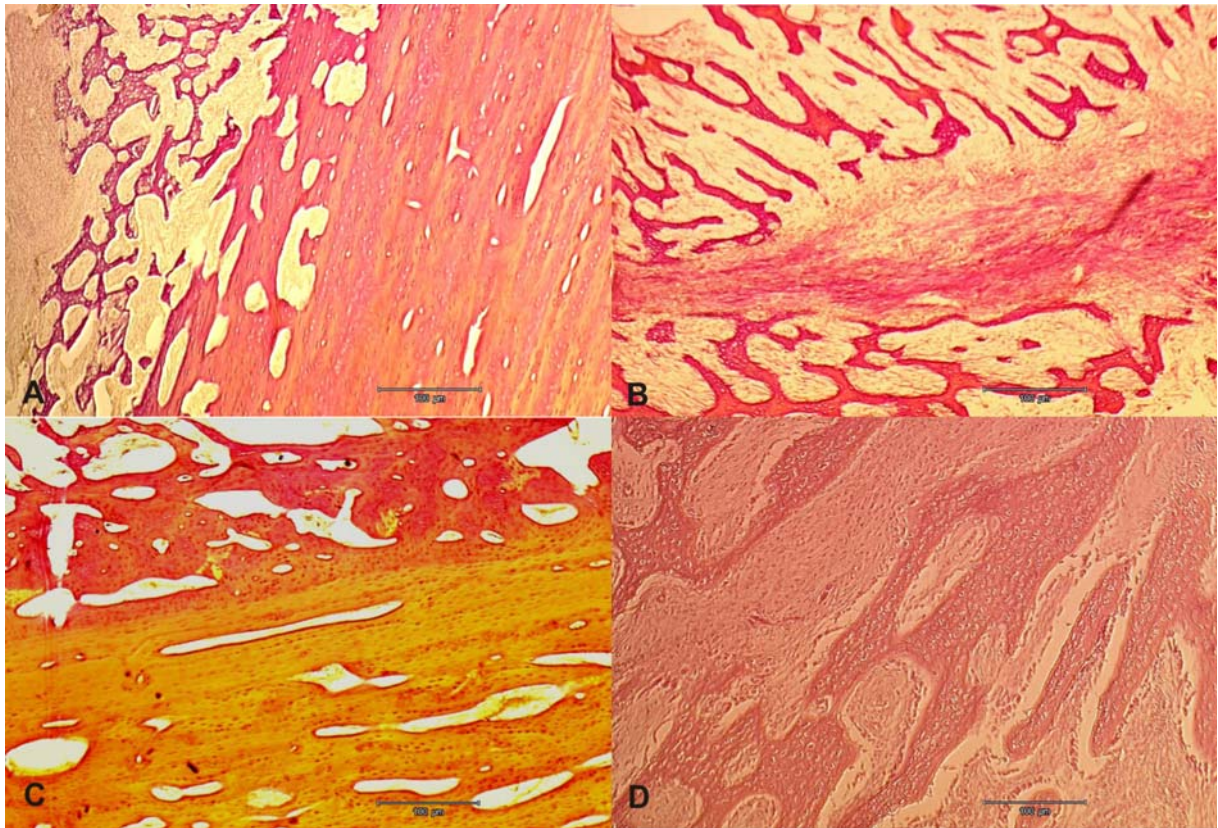


Joonis 1. Uudse kombineeritud fiksaatoriga fikseeritud pika toruluu paranemise dünaamika.



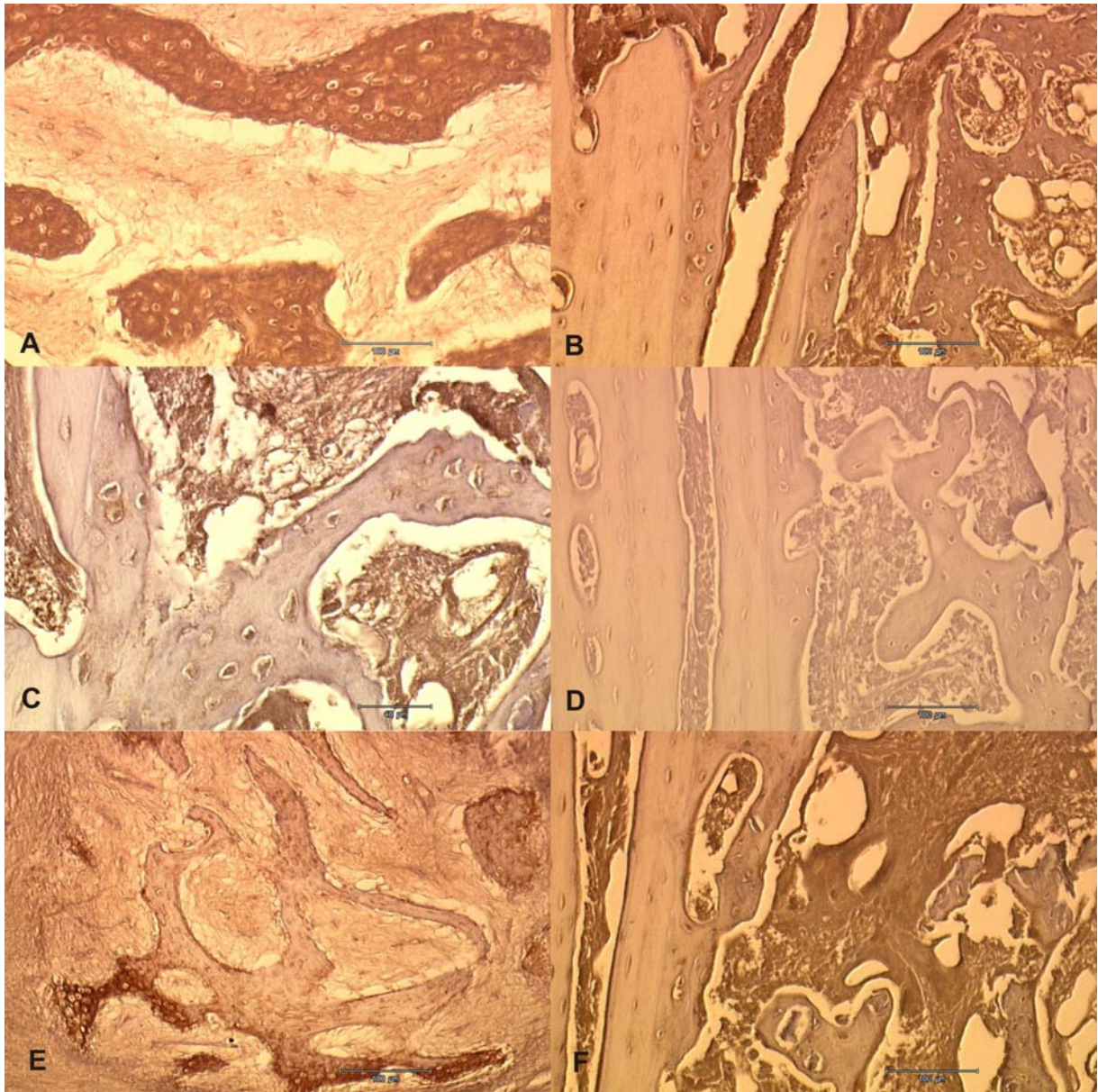
Joonis 2. Plaatfiksaatoriga fikseeritud pika toruluu paranemise dünaamika.

18.2. Morfoloogilised uuringud

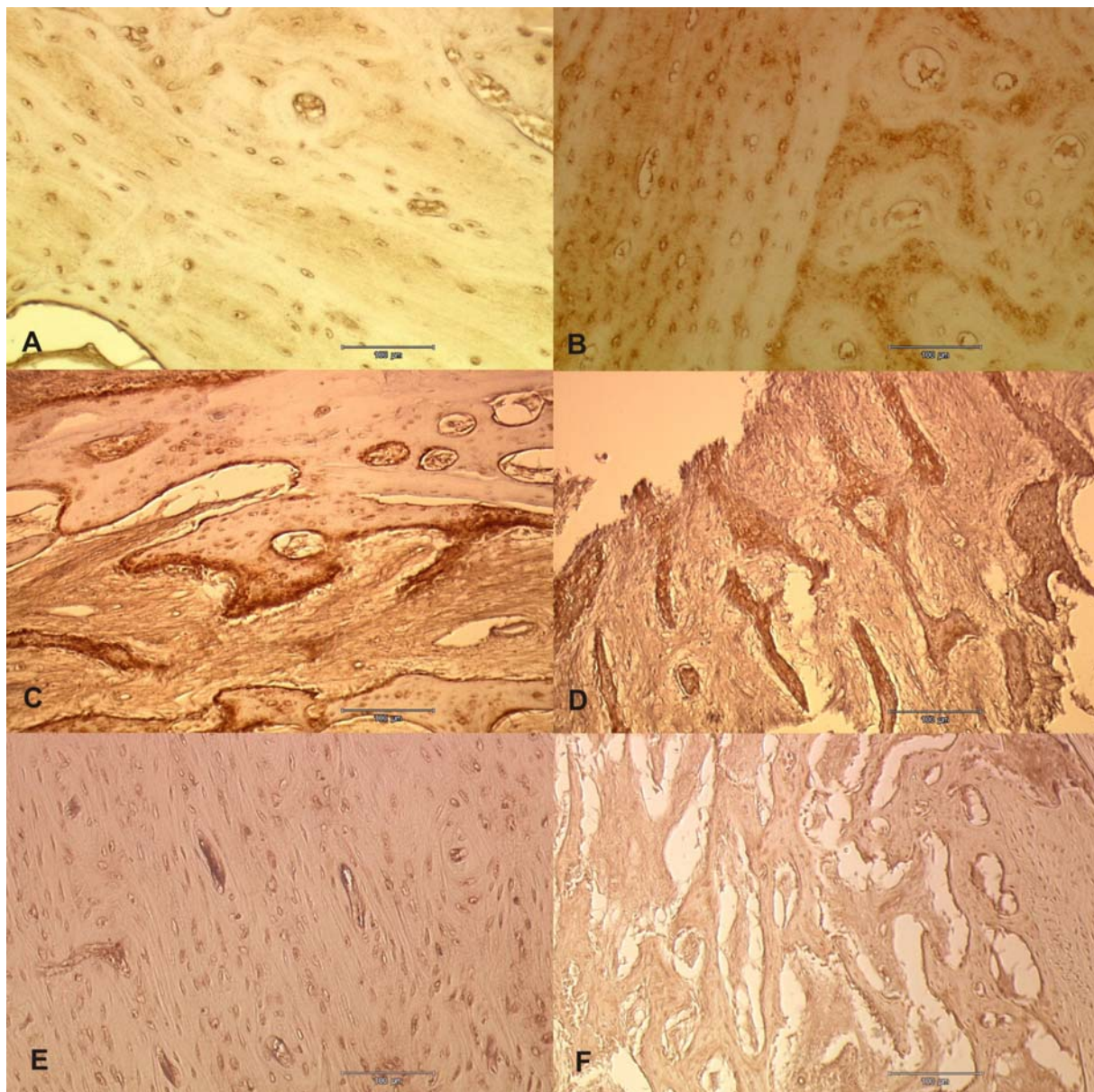


Joonis 1. Luukoe moodustumine lammastel.

Uudne kombineeritud fiksaator. A – katse 2 nädalat, toimub intensiivne luukoe moodustumine. B – katse 4 nädalat, noore luukoe moodustumine. C – katse 10 nädalat, toimunud on luukoe täielik paranemine. Plaatfiksaator: D – katse 10 nädalat, paranemine jätkub, uue luukoe hulk on veel tagasihoidlik. Värving H&E (A; B; D). Värving van Gieson (C).



Joonis 2. Kollageen I uudse fiksaatoriga loomadel katse teisel (A), neljandal (B) ja kümnendal (C) nädalal. Kollageen I plaatfiksaatoriga loomal (D) katse kümnendal nädalal. Kollageen V uudse (E) ja plaatfiksaatoriga (F) loomal katse kümnendal nädalal. Värving DAB + hematoksülin.



Joonis 3. Osteopontiin uudse fiksaatoriga loomadel katse teisel (A), neljandal (B) ja kümnendal (C) nädalal. Osteopontiin plaatfiksaatoriga loomal (D) katse kümnendal nädalal. Osteokaltsiin uudse (E) ja plaatfiksaatoriga (F) loomal katse kümnendal nädalal. Värving DAB + hematoksülin.